

УДК 615.45:616.9

**Антигенные и иммуногенные свойства  
кислотонерастворимого комплекса *Francisella tularensis*  
штамма 15 НИИЭГ в растворимой, адсорбированной  
и микрокапсулированной формах**

© 2017 А.Н. СОМОВ\*, Т.Б. КРАВЧЕНКО, В.М. ПАВЛОВ, Г.М. ВАХРАМЕЕВА,  
Т.И. КОМБАРОВА, Р.И. МИРОНОВА, В.В. ФИРСТОВА, О.В. КАЛМАНТАЕВА,  
С.С. ВЕТЧИНИН, А.Н. МОКРИЕВИЧ

ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» (ГНЦ ПМБ),  
Московская область, Оболensk, 142279

e-mail: somov@obolensk.org\*

Поступила 27.12.2016 г.

Принята в печать 10.05.2017 г.

Представлены результаты анализа антигенных и иммуногенных свойств препаратов кислотонерастворимого антигенного комплекса (КНК) на модели экспериментальной туляремии у мышей. Препараты получены путем выделения КНК из бактерий вакцинного штамма *Francisella tularensis* 15 НИИЭГ и их последующей адсорбции или микрокапсулирования в твердых носителях. В выделенном кислотонерастворимом антигенном комплексе белок, нуклеиновые кислоты и липополисахариды находятся в процентном соотношении 49:25:5. В составе КНК выявлено шесть иммунодоминантных белков, три из которых являются мажорными, что обусловлено избирательной экстракцией этих компонентов в процессе выделения. Иммунизация мышей линии BALB/c кислотонерастворимым антигенным комплексом как в виде коллоидного раствора, так и на твердом носителе (в форме микрокапсул и на алюмогеле) эффективно индуцировала гуморальный иммунный ответ. Тем не менее, этот ответ не позволял полностью защитить мышей от заражения природным штаммом *F. tularensis* из-за слабой специфической активации клеточного звена иммунитета.

*Ключевые слова:* *F. tularensis*, алюмогель, кислотонерастворимый антигенный комплекс, микрокапсулирование, субъединичная вакцина.

**doi:** 10.21519/0234-2758-2017-33-5-23-34

Субъединичным (химическим, молекулярным) вакцинам, свободным от недостатков вакцин, полученных на базе живых и убитых прокариотических клеток, посвящено много современных работ. Одна из проблем субъединичных вакцин – быстрая деградация антигенов в орга-

низме реципиента, резко снижающая возможности их представления клеткам иммунной системы. Нанесение антигенов на твердые носители, в частности микрокапсулирование, защищает антигены от инактивирующего действия тканевых энзимов, тем самым продлевая время их циркуляции

*Список сокращений:* БСА – бычий сывороточный альбумин; БХК – бицинохониновая кислота; ГГА – гель гидроксида алюминия; ИФА – иммуноферментный анализ; КЖ – культуральная жидкость; КНК – кислотонерастворимый комплекс антигенов *F. tularensis*; КОЕ – колониеобразующая единица; ЛД<sub>50</sub> – летальная доза для 50% тест-животных; ЛПС – липополисахарид(ы); МК – микрокапсулы, микрокапсулированный; МК-КНК – микрокапсулированный КНК; ММ – молекулярная масса; моноАГ – моноклональные антитела; НК – нуклеиновые кислоты, ОП – оптическая плотность; ПААГ-SDS – полиакриламидный гель с додецилсульфатом натрия; ПАК – протективный антигенный комплекс *F. tularensis*; ПЛГ – сополимер лактата и гликолята (поли(D,L-лактид-когликоolid)); ФИТЦ – флуоресцеин изотиоцианат; CD3, CD4, CD8, CD69 – антигенные маркеры лимфоцитов; CFSE – сукцинимидиловый эфир карбоксифлуоресцеина; PBS, PBS-T – фосфатно-солевой буферный раствор, то же с твином-20.

в организме и увеличивая эффективность защитных функций иммунной системы. Известно также, что корпускулярная форма сама по себе обладает адьювантным действием, усиливая иммунность антигенов. Эти обстоятельства определяют интерес исследователей к созданию новых препаратов на основе нано- и микрочастиц [1].

В ряду наиболее популярных и эффективных способов получения антигенов на твердом носителе выделяются микрокапсулирование с поли(D,L-лактид-когликолидом) и сорбция на геле гидроксида алюминия, алюмогеле (ГГА) [1–3]. Оба метода имеют длительную историю успешного применения и разрешены для медицинского использования. Технология нано- и микрокапсулирования позволяет достаточно просто получать препараты с большим содержанием белковых и других антигенов, защищенных оболочкой из биосовместимого ПЛГ, который разлагается в организме на обычные метаболиты (молочную и гликолевую кислоты) [1, 2]. Вакцинные препараты с антигенами, адсорбированными на микроскопических частицах алюмогеля, широко используются в ветеринарной и медицинской практике; в частности, на основе ГГА за рубежом создана химическая сибиреязвенная вакцина [1, 4].

Для профилактики туляремии в России и некоторых странах СНГ успешно применяют разработанную в 50–60-х годах прошлого века живую туляремийную вакцину на основе аттенуированного штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ [5]. Данная вакцина формирует длительный протективный иммунитет (5 лет и более); однако у некоторых привитых она вызывает нежелательные эффекты – повышение температуры, лихорадочное состояние, воспаление региональных лимфоузлов [3]. В настоящее время ведутся исследования по созданию субъединичных и химических вакцин, не содержащих живые бактерии и обладающих низкой реактогенностью [6, 7]. Среди субъединичных вакцин заслуживают внимания препараты, созданные на основе комплекса компонентов *F. tularensis* (липополисахариды, полисахариды, смесь белков и липидов), такие, как С-комплекс [8] и протективный антигенный комплекс (ПАК) [9–11]. Особенностью этих препаратов является способность образовывать осадок в водном растворе при кислых значениях pH и переходить в состояние коллоидного раствора при нейтральных и слабощелочных значениях [9, 12].

Цель настоящей работы – получение антигенного препарата на базе кислотонерастворимого комплекса из клеток вакцинного штамма

*F. tularensis* 15 НИИЭГ, создание на его основе адсорбированных и микрокапсулированных форм и изучение антигенных и иммуногенных свойств полученного препарата на модели экспериментальной туляремии у мышей.

## УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

### Бактериальные штаммы

Штаммы *F. tularensis* 15 НИИЭГ (коллекционный номер В-4341) и *F. tularensis* 503 (номер В-4676) были получены из Государственной коллекции патогенных микроорганизмов и клеточных культур «ГКПМ-Оболенск».

### Получение КНК

Все буферные и технологические растворы готовили из отечественных реагентов марки «х.ч.», «фармакопейный» или из соответствующих им по чистоте импортных реактивов.

Штаммы *F. tularensis* культивировали при температуре 37 °С на твердой питательной среде (FT-агар, ГНЦ ПМБ) и на жидкой питательной среде (FTВ) следующего состава, %: ферментативный гидролизат казеина – 2; дрожжевой экстракт – 1;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  – 1,2; глюкоза – 1; цистеин – 0,001;  $\text{FeCl}_2$  – 0,001, pH 7,2 [13]. Для получения биомассы штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ использовали ферментер емкостью 50 л (ВПУ НПК «Биотест», Кириши, Россия). Культивирование проводили в течение 9–12 ч до достижения культурой ОП, равной 1,8–2,0 при длине волны 590 нм. Объем культуры уменьшали с 30 л до 5 л, используя установку ультрафильтрации УПЛ-0,6 с мембранами на полых волокнах AP и порогом исключения 100 кДа (ВПУ НПК «Биотест»). Культуру инактивировали добавлением фенола до конечной концентрации 1% при комнатной температуре в течение 18 ч. Бактериальные клетки и кислотонерастворимые компоненты КЖ осаждали центрифугированием (центрифуга Beckman J2-21, ротор JA-10) при 8 000 об/мин в течение 20 мин после добавления к суспензии 5 М уксусной кислоты до pH 4,0 и выдерживания в течение 1 ч при 4 °С. Полученный осадок ресуспендировали в 0,1 М трис-буфере (pH 7,5) при массовом соотношении осадка и буфера 1:10 и после обработки ДНКазой (конечная концентрация 10 мг/л) (Fermentas, Литва) осаждали суспензию центрифугированием при тех же условиях, получая супернатант I.

Осадок разводили дистиллированной водой в соотношении 1:10 по массе, доводили pH суспензии до 7,5 добавлением 1 М трис-буфера (pH 7,5),

обрабатывали ДНКазой (10 мг/л), удаляли нерастворимые компоненты центрифугированием при тех же условиях и получали супернатант II.

Супернатанты I и II объединяли, и компоненты КНК осаждали 5 М уксусной кислотой при pH 4,3. Раствор выдерживали в течение 1 ч при температуре 4 °С и центрифугировали при тех же условиях. Для удаления примесей из препарата КНК осадок ресуспендировали в 1 мМ растворе ацетата натрия (pH 4,3) при массовом соотношении 1:10 и осаждали центрифугированием (центрифуга Beckman J2-21, ротор JA-20) при 14 000 об/мин в течение 20 мин.

Полученный осадок КНК растворяли в дистиллированной воде, доводя значение pH раствора до 7,5 добавлением 1 М трис-буфера (pH 7,5). После растворения осадка pH раствора снижали до 5,5 добавлением 5 М уксусной кислоты, выдерживали 1 ч при температуре 4 °С и выпавшие в осадок примеси удаляли центрифугированием, как описано выше. В осветленный раствор КНК добавляли 5 М уксусную кислоту до pH 4,3, выдерживали в течение 1 ч при температуре 4 °С и выпавший в осадок КНК отделяли центрифугированием. Очищенный препарат КНК растворяли в дистиллированной воде, доводя pH раствора до 7,5 добавлением 0,1 М раствора двузамещенного фосфата натрия и стерилизовали полученный раствор микрофильтрацией через мембрану с размером пор 0,22 мкм (стандартная насадка для шприца, Millipore, США). Сухой КНК без добавок получали путем сублимационной сушки (сушилка VirTis BenchTop «К», VIR-TIS, США).

Концентрацию белка в препарате КНК измеряли с помощью коммерческого набора для определения белка модифицированным методом BCA с использованием бицинониновой кислоты (БХК) и BCA в качестве белкового стандарта, согласно инструкции производителя (Sigma-Aldrich, США).

### Электрофорез и иммуноблотинг

Анализ белкового состава проводили путем электрофореза в 12,5%-ном полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия (ПААГ-SDS) по стандартной методике Лэммли с последующим окрашиванием Coomassie R250 (Sigma-Aldrich). Молекулярную массу белков определяли с помощью программы GelAnalyser 2010.

Имуноблотинг проводили по стандартной методике [14]. Белки после электрофоретического разделения переносили на PVDF-мембра-

ну (GE Healthcare, США), свободные центры связывания на мембране блокировали 3%-ным раствором, содержащим сухое обезжиренное молоко (Fluka, Швейцария), и инкубировали ее в течение 1 ч с кроличьей поликлональной антисывороткой к штамму *F. tularensis* 503 в разведении 1:500 при 37 °С. Связанные антитела визуализовали путем инкубации в течение 1 ч с вторичными козьими антителами к IgG кролика, конъюгированными с пероксидазой хрена (Sigma, США), в разведении 1:10 000 при температуре 3 °С. Последующее окрашивание проводили 0,04%-ным раствором 3,3'-диаминобензида тетрахлорида (Sigma) в 50 мМ трис-буфере, pH 8,0, в присутствии 0,03%-ной перекиси водорода.

### Адсорбция КНК на геле гидроксида алюминия (КНК+ГГА)

Для получения препарата КНК, адсорбированного на ГГА (Sigma, Дания), 7 мг лиофильно высушенного препарата КНК растворяли в 2,3 мл деионизированной воды и смешивали с 20 мг ГГА. Смесь выдерживали в течение 1 ч при 4 °С, после чего адсорбированный на алюмогеле КНК отделяли центрифугированием (Eppendorf 5424R, 5 000 об/мин, 5 мин).

### Микрокапсулирование препарата КНК

Для получения МК-КНК применяли полимер ПЛГ с молекулярной массой 19 кДа и соотношением остатков молочной и гликолевой кислот 50:50 (Sigma, США). Использовали метод, описанный в работе [2] с некоторыми изменениями. Водный раствор КНК (1 мл) смешивали с 1 мл 10%-ного водного раствора поливинилового спирта с молекулярной массой 70–100 кДа (Sigma, США), затем при помощи механического дезинтегратора Polytron (Швейцария) диспергировали смесь в 20 мл 0,5%-ного раствора ПЛГ в хлороформе со стеаратом сахарозы в качестве эмульгатора (Carbosynth, Великобритания), получая первичную эмульсию типа «вода в масле». Эмульсию капельно при постоянном перемешивании вносили в 250 мл 0,5%-ного раствора поливинилпирролидона в PBS, pH 7,4. Затем хлороформ выпаривали, получая микрокапсулы, которые отделяли от раствора центрифугированием (Beckman J2-21, ротор JA-12, 40 мин при 11 000 об/мин).

Включение КНК в микрокапсулы (отдельный эксперимент) контролировали путем введения в комплекс флуорохромной метки – красителя ФИТЦ – методом, описанным в работе [15].

Наличие в микрокапсулах полученного меченого препарата анализировали при помощи люминесцентного микроскопа «Биомед» («ОМО», Россия).

Оценку доли КНК, связанной с микрокапсулами, проводили спектрофотометрически при максимуме поглощения флуорохрома (258 нм). Использование КНК, меченого ФИТЦ, позволило увеличить чувствительность спектрофотометрического определения концентрации модифицированного КНК в растворе (максимум поглощения при  $\lambda = 495$  нм) в 2 раза.

### Получение препарата КНК смешанного типа (МК-КНК+ГГА)

К свежеприготовленной суспензии микрокапсулированного КНК капельно при постоянном перемешивании добавляли разбавленный водой гель гидроокиси алюминия из расчета 1 мг ГГА на 1 мг КНК.

Все адсорбированные и микрокапсулированные препараты КНК высушивали в стандартном режиме на сублимационной сушилке VirTis BenchTop «К» (VIRTIS).

### Агглютинация микрокапсул

К капле суспензии микрокапсулированного КНК (20 мкл) на предметном стекле добавляли поликлональную сыворотку в разведении 1:20, полученную на 28-е сутки после однократной подкожной иммунизации кролика клетками штамма *F. tularensis* 503 в дозе  $5 \cdot 10^6$  КОЕ/животное. Для сравнения вместо специфической сыворотки использовали нормальную кроличью сыворотку в том же разведении. За процессом агрегации микрокапсул наблюдали с помощью микроскопа «Микмед-2» («ОМО»).

### Количественное определение концентрации ЛПС

Количество ЛПС в препарате КНК определяли методом предельных разведений в дот-блоттинге с помощью мышинных моноклональных антител FB11-х к ЛПС штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ, полученных из асцитной жидкости мышей методом аффинной хроматографии на белок А-сефарозе [16]. В качестве стандартного препарата использовали ЛПС штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ,

выделенный водно-фенольным методом [17]. Различные количества ЛПС и КНК в PBS (рН 7,5) (от 100 нг до 0,018 нг) наносили в объеме 2 мкл/точка на полоски нитроцеллюлозной мембраны (Sigma); полоски высушивали и инкубировали при температуре 37 °С в течение 1 ч в растворе 1%-ного БСА в PBS. Буфер трехкратно по 5 мин отмывали PBS с добавлением 0,5% твина 20 (PBS-T) в объеме 5 мл на качалке. Мембраны инкубировали с раствором моноАТ FB11х в разведении 1:10<sup>5</sup> из исходного раствора 2,5 мг/мл (экспериментальная полоска) и с нормальной мышшиной сывороткой в том же разведении (контрольная полоска) при температуре 37 °С в течение 1 ч. Затем мембраны снова трехкратно отмывали PBS-T, добавляли конъюгат кроличьих антимышиных IgG с пероксидазой хрена (Sigma, США) в рабочем разведении, инкубировали при температуре 37 °С в течение 1 ч и отмывали пятикратно PBS-T (5 мин, 25 °С). Полоски окрашивали 0,04%-ным раствором 3,3'-диаминобензидинтетрахлорида (Sigma) в 50 мМ трис-буфере, рН 8,0, в присутствии 0,03% перекиси водорода.

### Работа с тест-животными

**Источник и принципы работы.** Использовали мышей линии BALB/c(H2<sup>d</sup>) (ФИБХ, питомник «Пушино», Московская область) в возрасте 6–8 нед с массой тела 18–20 г. Работу с животными проводили в соответствии с законодательством Российской Федерации<sup>1</sup> и Директивой Европейского парламента и Совета Европейского Союза по охране животных, используемых в научных целях<sup>2</sup>.

**Иммунизация животных.** Лиофильно высушенные препараты разводили водой для инъекций и вводили мышам в верхнюю треть бедра подкожно в дозе 30 или 60 мкг/мышь в объеме 0,1 мл 1–5-кратно и с интервалом  $28 \pm 2$  дня.

**Оценка иммунного статуса животных.** На 28-е сутки после каждой иммунизации по три мыши из каждой группы эвтаназировали ингаляцией CO<sub>2</sub> и отбирали кровь для определения титра специфических антител и селезенку для оценки клеточного иммунитета. Титр антител определяли методом ИФА [18]. Адсорбцию антигена из коллоидного раствора КНК в концентрации

<sup>1</sup>Приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации от 19.06.2003 года № 267 «Об утверждении Правил лабораторной практики в Российской Федерации».

<sup>2</sup>Директива 2010/63/EU Европейского парламента и совета Европейского союза по охране животных, используемых в научных целях. Санкт-Петербург: 48 с.



7 мкг/мл осуществляли на планшетах (BD, e-Bioscience, США). Клеточный иммунитет оценивали по числу CD69-позитивных В- (CD19+) и Т- (CD3+CD4+, CD3+CD8+) лимфоцитов (в % от общего количества лимфоцитов) в популяции спленоцитов, а также по их пролиферативной активности при добавлении КНК [19].

**Оценка протективности исследуемых препаратов КНК.** Для заражения мышей использовали штамм *F. tularensis* 503 в дозе от 60 до 300 КОЕ/мышь и вакцинный штамм *F. tularensis* 15 НИИЭГ в дозе  $7 \cdot 10^4$  КОЕ/мышь. Инфицирование животных проводили подкожно через 28 дней после последней иммунизации. Погибших и эвтаназированных ингаляцией CO<sub>2</sub> животных вскрывали и определяли бактериальную обсемененность печени и селезенки методом посева на твердую питательную среду. Среднее время жизни мышей рассчитывали как среднее арифметическое значение показателя только для погибших животных.

**Статистические методы обработки результатов.** Для обработки результатов использовали стандартные методы математической статистики с вычислением средних арифметических значений величин и среднеквадратических отклонений; для анализа различий между группами применяли метод Стьюдента.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

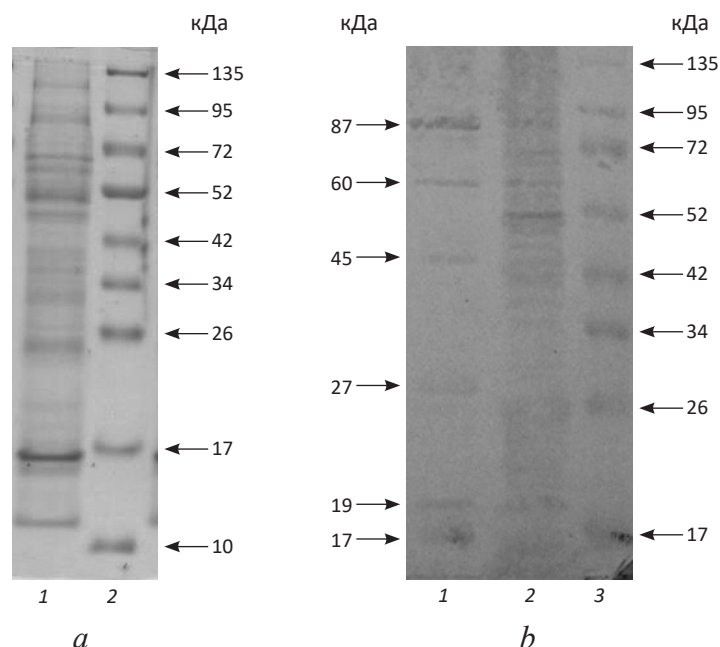
### Выделение и характеристика препарата КНК

В результате культивирования штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ в жидкой питательной среде (ФТВ) было получено 200 г сырой биомассы, из которой после экстракции, очистки и лиофильной сушки был получен 1 г сухого препарата КНК.

Обработка бактериальной суспензии водным раствором фенола при pH 7,2 обеспечивала экстракцию ряда компонентов биомассы, часть которых при снижении pH до 4,3 выпадала в осадок, получивший название «кислотонерастворимый комплекс» (КНК). Полученный препарат КНК был стабилен в лиофильно высушенном виде в течение 10 лет при температуре  $6 \pm 2$  °С (собственные данные регулярных проверок в течение указанного срока). При регидратации препарат полностью растворялся с образованием слегка опалесцирующего коллоидного раствора.

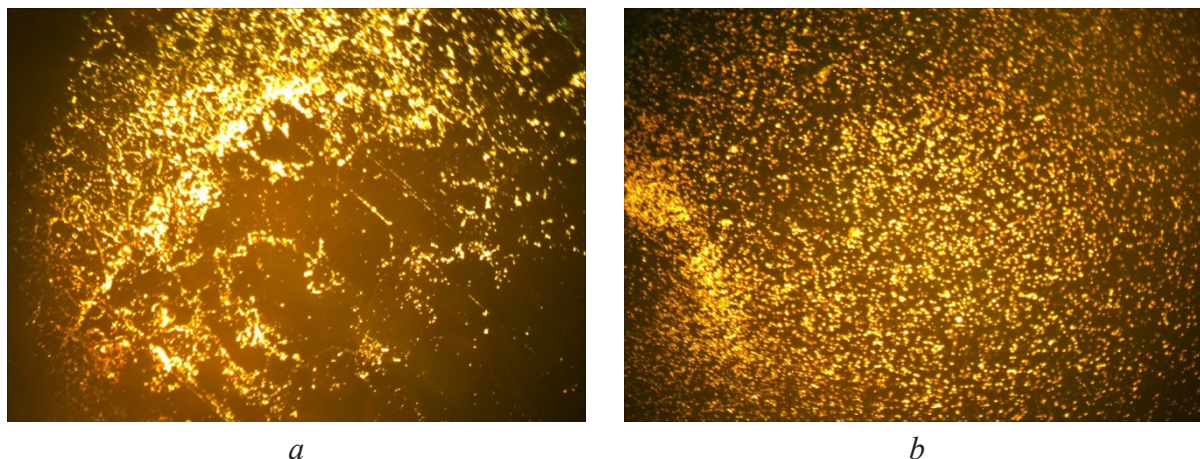
Спектрофотометрический (данные не приведены) и электрофоретический анализ (рис. 1) показали, что КНК имеет сложный состав, в котором помимо липополисахаридов и нуклеиновых кислот присутствует широкий спектр белков *F. tularensis*.

Содержание ЛПС, определенное методом дот-блот-анализа с помощью мышиных



**Рис. 1.** Результаты электрофореза в 12,5%-ном ПААГ-SDS (a) и иммуноблотинга (b) полученного препарата КНК. Дорожка 1 – препарат КНК; дорожка 2 (a) и 3 (b) – белковые маркеры ММ Spectra Multicolor 260-10 кДа (Thermo Scientific, США); дорожка 2 (b) – клеточный лизат штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ

**Fig. 1.** Electrophoresis in 12.5% PAG-SDS (a) and immunoblotting (b) of obtained AIAC preparation. Lane 1, AIAC; lane 2 (a) and lane 3 (b), protein MM markers of Spectra Multicolor 260-10 kDa (Thermo Scientific, USA); lane 2 (b), cell lysate of *F. tularensis* 15 NIEG



**Рис. 2.** Микрофотографии препаратов МК-КНК через 15 мин после их добавления к антиуляремийной (а) и нормальной (б) кроличьим сывороткам. Увеличение  $\times 60$

**Fig. 2.** Microphotographs of microencapsulated AIAC preparations 15 min after their addition to antitularemia (a) and normal rabbit (b) serum. Enlargement of  $\times 60$

моноклональных антител FB11-х к ЛПС штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ, составляло не менее 5% от сухой массы КНК.

Общее содержание НК в препарате КНК по данным спектрофотометрических измерений составило около 25% от массы сухого вещества.

Количественное определение белка методом ВСА показало, что концентрация общего белка в препарате КНК равна 0,4 мг/мл (49%). Следовательно, в сухой массе препарата КНК соотношение белок:НК:ЛПС составляет 49:25:5%, или приблизительно 10:5:1.

Сравнительный анализ антигенного состава препарата КНК и клеточного лизата штамма-продуцента *F. tularensis* 15 с помощью иммуноблоттинга с кроличьей антисывороткой к *F. tularensis* 503 показал, что в составе КНК присутствует не менее шести иммунодоминантных белковых компонентов с ММ  $\sim 87, 60, 45; 27, 19$  и  $17$  кДа (см. рис. 1б). Среди них три белка (ММ 87; 27 и 17 кДа) присутствуют в большей концентрации, чем в исходном клеточном лизате (см. рис. 1б), что можно связать с избирательной экстракцией этих компонентов в процессе выделения КНК.

### Получение микрокапсулированной формы КНК

По данным спектрофотометрических измерений, использованная методика получения МК-КНК (см. раздел «Условия эксперимента») позволила включить в состав микрокапсул более 90% компонентов КНК (расчеты не приведены). Дополнительное подтверждение включения в состав микрокапсул и экспонирования компонен-

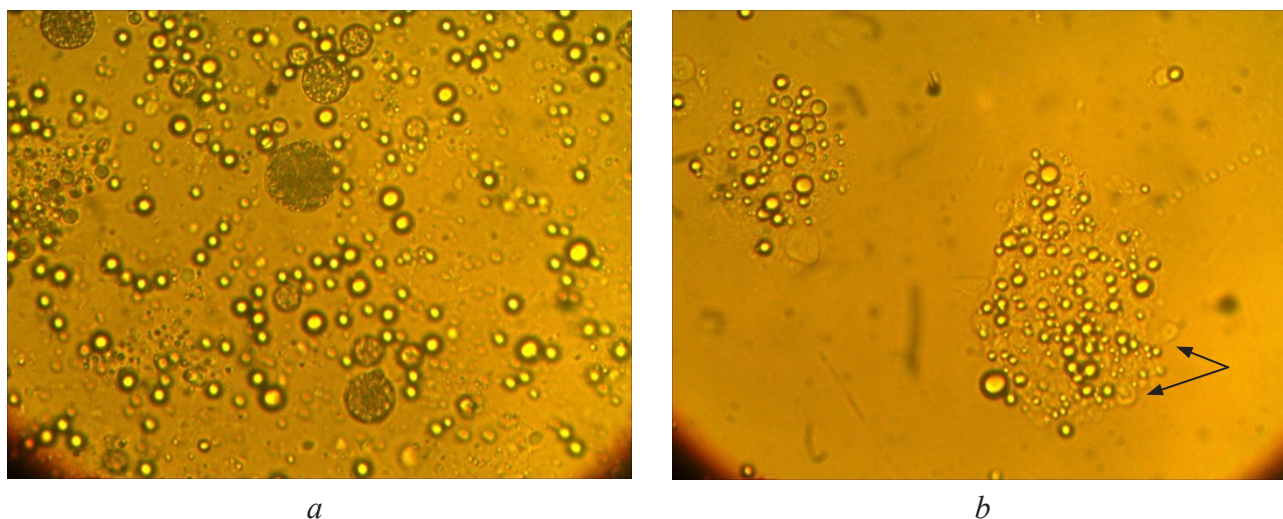
тов КНК на их поверхности было получено при помощи реакции агглютинации суспензии МК-КНК с антиуляремийной и нормальной кроличьими сыворотками (рис. 2).

Наличие агрегатов в препаратах МК-КНК в присутствии специфических антител свидетельствует о том, что часть иммуногенных компонентов МК-КНК находится на поверхности капсул и доступна для взаимодействия со специфическими антителами; это было подтверждено и прямым наблюдением под микроскопом свечения меченого КНК в микрокапсулах (данные не приведены).

Нами было показано, что препараты МК-КНК стабильны и выдерживают лиофильное высушивание с последующей регидратацией без заметной потери активности (см. выше). Микроскопическое исследование показало, что регидратированный препарат МК-КНК представляет собой суспензию сферических частиц размером от 1 до 15 мкм (рис. 3а). При добавлении ГТА в суспензию МК-КНК формировались сложные агрегаты, состоящие из обоих компонентов (рис. 3б).

Иммуногенные свойства КНК изучали путем подкожного введения регидратированных препаратов мышам (см. раздел «Условия эксперимента»).

Сравнение титров специфических антител к КНК после двукратной иммунизации препаратами, содержащими 30 мкг исходного и адсорбированного КНК, показало, что исследованные препараты незначительно различаются по способности индуцировать выработку специфических антител: титр антител в обоих случаях варьировал от 1:320 до 1:640.



**Рис. 3.** Микрофотографии препаратов, регидратированных после лиофильного высушивания: *a* – суспензия МК-КНК и *b* – смесь МК-КНК и ГГА. Стрелки указывают на полупрозрачное «облако» ГГА, образованное вокруг мелких округлых частиц МК-КНК. Увеличение  $\times 600$

**Fig. 3.** Microphotographs of preparations rehydrated after freeze-drying: (*a*), microencapsulated AIAC suspension; and (*b*), mixture of microencapsulated AIAC suspension and alumogel. Arrows show a translucent *cloud* of alumogel that surrounds small rounded AIAC encapsulated particles. Enlargement of  $\times 600$

Активацию клеточного звена иммунной системы мышей оценивали по пролиферации лимфоцитов в ответ на введение антигенов, входящих в состав КНК, а также по доле активированных Т-хелперов и цитотоксических лимфоцитов (табл. 1).

Таким образом, достоверных различий в значениях коэффициента специфической пролиферации лимфоцитов мышей и в количестве активированных Т-хелперов (CD3+ CD4+ CD69+) и цитотоксических лимфоцитов (CD3+ CD8+ D69) при двукратной иммунизации различными препаратами КНК, а также между экспериментальными

и контрольной группами животных выявлено не было. Напротив, популяция В-лимфоцитов достоверно активировалась, что коррелирует с ростом титра специфических антител в сыворотке крови мышей.

Увеличение числа иммунизаций до пяти привело к росту коэффициента пролиферации в группе мышей, иммунизированных МК-КНК. Доля пролиферирующих В-лимфоцитов в среде с КНК в течение 6 сут возросла с 1,81% до 10,4% (рис. 4*b* и 4*d*). У мышей, иммунизированных раствором КНК, был отмечен менее выраженный рост пула

Таблица 1

#### Параметры клеточного иммунитета мышей после двукратной иммунизации препаратами КНК

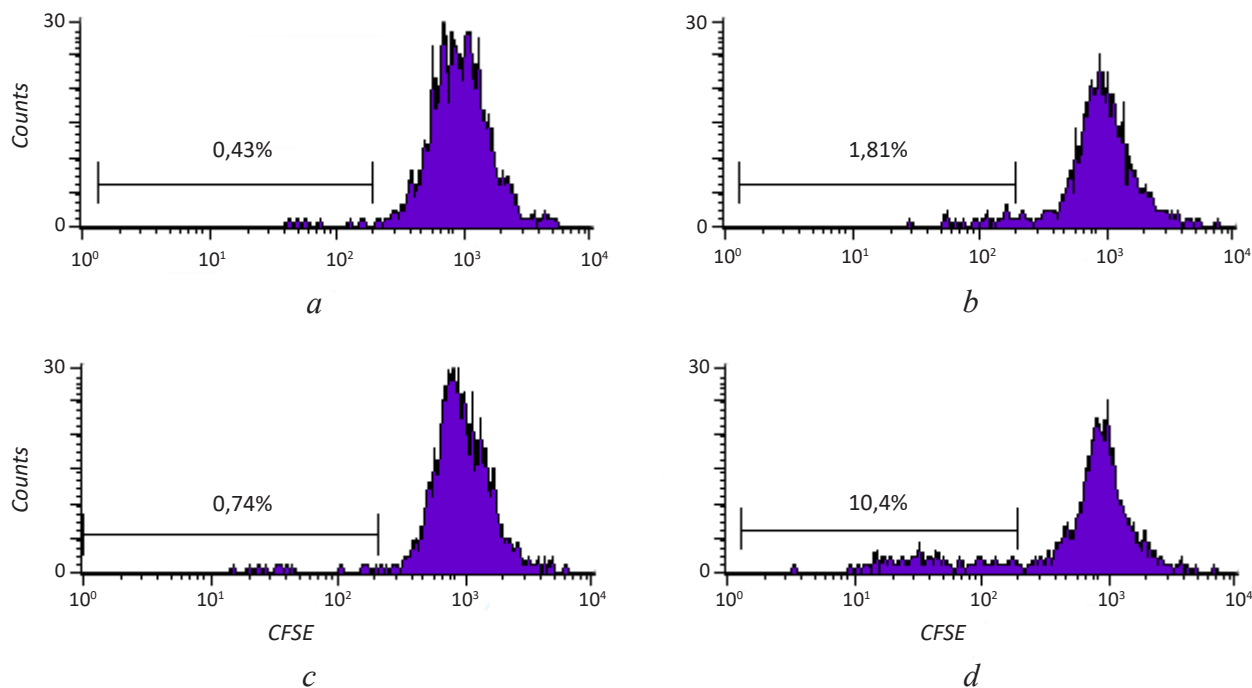
#### Parameters of cellular immunity of mice after double immunization with AIAC preparations

Препарат для иммунизации	В-лимфоциты CD19+CD69+	Т-хелперы CD3+ CD4+ CD69+	Цитотоксические лимфоциты CD3+ CD8+ CD69+	Коэффициент пролиферации лимфоцитов
КНК + ГГА	$2,39 \pm 0,35$	$1,6 \pm 0,6$	$0,25 \pm 0,2$	$1,5 \pm 0,4$
МК-КНК	$3,81 \pm 0,45$	$1,8 \pm 0,7$	$1,10 \pm 0,2$	$1,8 \pm 0,5$
МК-КНК +ГГА	$1,50 \pm 0,12$	$1,5 \pm 0,6$	$0,90 \pm 0,2$	$2,3 \pm 0,6$
Контроль (интактные мыши)	$1,23 \pm 0,39$	$1,5 \pm 0,4$	$1,00 \pm 0,2$	$1,7 \pm 0,5$

*Примечание:* приведены средние арифметические значения и стандартные отклонения для трех независимых измерений. Число CD69-позитивных Т-лимфоцитов указано в % от общего количества лимфоцитов.

*Footnote:* arithmetic means and standard deviations for three independent experiments are represented. Number of CD69-positive T lymphocytes is shown in percent to total lymphocyte number.





**Рис. 4.** Цитофлюорограмма пролиферирующих Т-лимфоцитов (*a, c*) и В-лимфоцитов (*b, d*) у мышей, пятикратно иммунизированных МК-КНК, после инкубации в среде без КНК (*a, b*) и в среде, содержащей КНК (*c, d*). Проценты на диаграмме указывают долю пролиферирующих лимфоцитов. Клетки были предварительно окрашены сукцинимидиловым эфиром карбоксифлуоресцеина (CFSE). По оси X приведен уровень флуоресценции, коррелирующий с числом пролиферирующих лимфоцитов, по оси Y – число импульсов, соответствующее внутриклеточной концентрации красителя. Максимальный пик соответствует популяции неделящихся клеток; при каждом делении клетки интенсивность ее свечения снижается в 2 раза (на диаграмме эти популяции отражены в виде сигналов под горизонтальной чертой, над которой указана доля таких пролиферировавших клеток в %

**Fig. 4.** Cytofluorogram of proliferating T (*a, c*) and B (*b, d*) lymphocytes in mice after 5-fold immunization with microencapsulated AIAC and following incubation in medium with (*c, d*) or without (*a, b*) AIAC. Percents on diagram show the number of proliferating lymphocytes. Cells were preliminary stained with carboxyfluorescein succinimidyl ester (CFSE). X-axis: fluorescence intensity depending on number of lymphocyte proliferation cycles; Y-axis: number of impulses depending on intracellular dye concentration. The greatest peak corresponds to the non-proliferating cell population; after cell each division its fluorescence intensity is reduced by 2 times; signals of these populations are represented under horizontal line, figures above the line show the share of proliferating cell subpopulation in per cent

активированных В-лимфоцитов (с 0,6% до 3,0%), чем у животных, иммунизированных МК-КНК.

Анализ субпопуляций специфически пролиферирующих Т-лимфоцитов не зафиксировал достоверного роста их числа в присутствии КНК (см. рис. 4*a* и 4*c*).

В целом Т-клеточное звено иммунного ответа в отличие от В-клеток слабо реагировало на вакцинацию. Даже после 5-кратного введения антигенного комплекса отмечалась лишь небольшая тенденция к росту CD69+ Т-хелперов в случае микрокапсулированных препаратов; а пул цитотоксических клеток заметно не менялся. Достоверного увеличения количества активированных Т-хелперов CD3+ CD4+ CD69+ и цитотоксических лимфоцитов CD3+ CD8+ D69 под влиянием растворенного КНК обнаружено не было (см. табл. 1 и рис. 4).

В экспериментах по изучению протективности иммунных мышей заражали природным (вирулентным) штаммом *F. tularensis* 503 или вакцинным штаммом *F. tularensis* 15 НИИЭГ в высокой дозе (см. раздел «Условия эксперимента»).

Прямое сравнение показало, что однократная иммунизация КНК в дозе 30 мкг/мышь независимо от формы препарата защищала иммунных мышей от внутрибрюшинного заражения слабовирулентным штаммом *F. tularensis* 15 НИИЭГ в дозе  $7 \cdot 10^4$  КОЕ/мышь. При инфицировании животных штаммом *F. tularensis* 503 в дозе 500 КОЕ/мышь время жизни мышей увеличивалось на 2–3 дня по сравнению с контрольной неиммунной группой (табл. 2).

Двукратная иммунизация в дозе 30 мкг/мышь с последующим инфицированием штаммом *F. tularensis* 503 в двух различных дозах (60 и



**Протективный эффект различных препаратов КНК при однократной иммунизации мышей (доза 30 мкг/мышь) и последующем заражении штаммом *F. tularensis* 503 (500 КОЕ/мышь)**Protectiveness of various AIAC preparations after single immunization (30 µg/mouse) and following contamination of mice by *F. tularensis* 503 strain (500 CFU/mouse)

Препарат для иммунизации	Число павших/общее число мышей	Среднее время жизни, сут
КНК + ГГА	4/5	9,3
МК-КНК	5/5	8,4
МК-КНК + ГГА	5/5	9,2
Контроль (интактные мыши)	5/5	6,0

300 КОЕ/мышь) также не защищала от гибели зараженных мышей (выжила лишь одна мышь в группе животных, иммунизированных комбинированным препаратом МК-КНК+ГГА), но приводила к продлению времени жизни на 2–4 дня по сравнению с контрольной неиммунной группой (табл. 3).

Из данных, приведенных в табл. 3, видно отсутствие прямой корреляции между степенью активации специфического гуморального иммунитета и средней продолжительностью жизни инфицированных животных. Очевидно также, что пятикратное увеличение заражающей дозы с 60 до 300 КОЕ/мышь не приводило к достоверному сокращению средней продолжительности жизни в исследуемых группах.

В последующих экспериментах изучали влияние многократной иммунизации КНК на развитие протективности у мышей при туляреминой инфекции. Кроме интактных были использова-

ны животные еще двух контрольных групп, получившие препараты ненагруженных микрокапсул и смеси ненагруженных микрокапсул с ГГА. Перед каждой иммунизацией проводили оценку гуморального иммунного ответа мышей по титру специфических антител к туляреминым антигенам. Полученные данные об уровне специфических антител и среднем времени жизни зараженных мышей приведены в табл. 4.

Как можно видеть из приведенных в табл. 4 данных, однократная иммунизация препаратами КНК приводила к увеличению среднего времени жизни более, чем на 3 сут по сравнению с контрольной группой (9,8; 9,2 против 5,7 сут, соответственно). После 3-кратной иммунизации среднее время жизни в группах, вакцинированных КНК-содержащими препаратами, увеличилось до 11 сут по сравнению с ~ 6 сут в контрольных группах. Увеличение числа иммунизаций до пяти

**Протективность различных форм препаратов КНК при двукратной иммунизации (30 мкг/мышь) и последующем заражении штаммом *F. tularensis* 503 в различных дозах**Protectiveness of various forms of AIAC preparation after twofold immunization (30 µg/mouse) and following contamination with various doses of *F. tularensis* 503 strain

Препарат для иммунизации	Средний реципрокный титр антител к КНК перед заражением	Доза заражения, КОЕ/мышь	Число павших/общее число мышей	Среднее время жизни, сут
КНК + ГГА	640	60	6/6	7,5
		300	6/6	7,5
МК-КНК	320	60	6/6	10,0
		300	6/6	8,2
МК-КНК + ГГА	480	60	5/6	9,4
		300	6/6	9,3
Контроль (интактные животные)	< 20	60	3/3	6,0
		300	3/3	6,0

**Влияние кратности иммунизации различными препаратами КНК на параметры гуморального ответа и выживаемость мышей после заражения штаммом *F. tularensis* 503 (100 КОЕ/мышь)**

**Effect of immunization with various AIAC preparations on parameters of humoral response and survival of mice after contamination with *F. tularensis* 503 (100 CFU/mouse)**

Препарат для иммунизации	Реципрокный титр антител к КНК при иммунизации			Среднее время жизни при иммунизации, сут		
	1-кратной	3-кратной	5-кратной	1-кратной	3-кратной	5-кратной
Контроль (без иммунизации)	<20	<20	<20	5,7	5,7	5,3
Ненагруженные микрокапсулы	<20	<20	<20	6,0	6,2	5,8
Ненагруженные микрокапсулы с ГГА	<20	<20	<20	5,8	6,4	6,0
КНК + ГГА ( суспензия с адсорбированным антигеном) (60мкг/мышь)	240	1920	20480	9,8	11,2	10,6
МК-КНК +ГГА (60 мкг/мышь)	160	7040	20480	9,2	10,8	9,0 (одно животное выжило)
МК-КНК +ГГА (30 мкг/мышь)	160	9600	20480	9,2	9,3	10,8 (одно животное выжило)

не привело к дальнейшему увеличению среднего срока жизни ни в одной из групп. Однако в группах, получивших МК-КНК + ГГА в дозах 30 и 60 мкг/мышь, выжило по одной из 5 мышей, т.е. протективность составила 20%. Пятикратное введение мышам микрокапсулированных препаратов без антигенного комплекса (контрольные группы) также не оказывало существенного влияния на среднюю продолжительность жизни животных по сравнению с интактными (5,8, 6,0 и 5,3 сут, соответственно).

Указанные изменения в протективности происходили на фоне нарастания титров специфических антител в сыворотке крови мышей до 1:20480 после пятой иммунизации (см. табл. 4).

На основании полученных в работе данных можно сделать вывод о том, что КНК как в растворенном виде, так и в составе препаратов на носителях, индуцирует у мышей в большей степени гуморальный, а не клеточный, иммунный ответ. Мыши с таким иммунитетом были устойчивы к заражению слабовирулентным штаммом *F. tularensis* 15 НИИЭГ, но погибали от заражения природным штаммом *F. tularensis* 503. Наши выводы согласуются с положением об основной роли клеточного звена иммунного ответа в защите теплокровных животных от туляремийной инфекции [20, 21].

Подчеркнем, что с увеличением кратности вакцинаций амплитуда гуморального ответа нарастала (рост титра специфических антител, увеличение относительного содержания субпопуляции активированных CD19+CD69+ В-лимфоцитов, повышение коэффициента пролиферативной активности лимфоцитов), но при этом продолжительный контакт с антигенами очень слабо отражался на клеточном звене иммунитета.

Достаточно подробно изучены иммуногенные свойства полученного сходным способом протективного антигенного комплекса (ПАК) [9, 10]. Выживаемость мышей, иммунизированных ПАК, составляла более 80% при заражении бактериями *F. tularensis* subsp. *holarctica* и 50% – при заражении *F. tularensis* subsp. *tularensis*, однако, состав антигенного комплекса и КНК существенно различаются.

Заметим, что в описанных экспериментах выжившие животные были вакцинированы препаратом на твердом носителе МК-КНК+ГГА. На наш взгляд, повышение выживаемости при инфекции было результатом пролонгированного действия микрокапсулированного препарата. Сами по себе микрочастицы в препаратах ПЛГ и ГГА, как было показано, не влияли на уровень протективности; в то же время, КНК в составе микрокапсул или адсорбированный на ГГА явно увеличивал время

жизни зараженных экспериментальных животных (вероятно, с самым сильным иммунитетом) вплоть до их выживания. Эти выводы соответствуют предположениям о перспективности вакцинных препаратов с пролонгированным высвобождением антигенов [22].

Увеличение числа иммунизаций мышей препаратом КНК до пяти хотя и привело к индукции высокого титра специфических антител, но не обеспечило увеличения средних сроков жизни ни в одной из групп. Для активации клеточного звена иммунного ответа необходимо в состав прототипа химической противотуляремийной вакцины на основе КНК включать вещества, обладающие адьювантным действием и стимулирующие как гуморальное, так и клеточное звенья иммунитета [1].

Обобщая полученные данные, можно заключить, что разработанный нами способ позволяет выделять из бактерий вакцинного штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ комплексный антигенный препарат КНК, в котором белки, нуклеиновые кислоты и ЛПС находятся в массовом соотношении 49:25:5. В белковой фракции препарата присутствует шесть иммунодоминантных белковых компонентов; при этом относительное содержание трех из них выше, чем в интактной биомассе.

Впервые получен микрокапсулированный препарат КНК на основе поли(D,L-лактид-когликолида), который сохранял антигенные свойства КНК. Показано, что препараты КНК на твердых носителях (микрокапсулированные и адсорбированные на геле гидроксида алюминия) по иммуногенности не уступают препаратам исходного, не связанного с носителями, комплекса.

Препараты КНК обеспечивали защиту от заражения мышей слабовирулентным штаммом *F. tularensis* 15 НИИЭГ, главным образом, путем активации гуморального звена специфического иммунитета, но не обеспечивали полную защиту от заражения высоковирулентным природным штаммом *F. tularensis* 503 в дозе 500 ЛД<sub>50</sub>.

Созданные в ходе работы препараты могут быть использованы для изучения роли отдельных звеньев иммунитета в защите от туляремии на различных биологических моделях, а также для создания диагностических и профилактических препаратов.

Работа выполнена в рамках НИР 048 «Изучение механизмов патогенеза и иммуногенеза туляремийной инфекции и мониторинг за циркуляцией возбудителя в отдельных регионах Российской Федерации» Отраслевой научно-исследовательской программы Роспотребнадзора на

2016–2020 гг. «Проблемно-ориентированные научные исследования в области эпидемиологического надзора за инфекционными и паразитарными болезнями».

## ЛИТЕРАТУРА

1. De Koker S., Lambrecht B.N., Willart M.A. et al. Designing polymeric particles for antigen delivery. *Chem. Soc. Rev.*, 2011, 40, 320–339.
2. Griffin K.F., Eyles J.E., Spiers I.D. et al. Protection against plague following immunization with microencapsulated V antigen is reduced by co-encapsulation with IFN- $\gamma$  or IL-4, but not IL-6. *Vaccine*, 2002, 20, 3650–3657.
3. Медуницын Н.В. Вакцинология. Изд. 2-е, перераб. и доп. М.: Триада-Х, 2004, 146-152, 159-160, 168-185, 344, 448.
4. Brito L.A., O'Hagan D.T. Designing and building the next generation of improved vaccine adjuvants. *J. Controlled Release*, 2014, 190, 563–579.
5. Олсуфьев Н.Г. Таксономия, микробиология и лабораторная диагностика возбудителя туляремии. М.: Медицина, 1975, 192.
6. Noah C.E., Malik M., Bublitz D.C. et al. GroEL and lipopolysaccharide from *Francisella tularensis* Live Vaccine Strain synergistically activate human macrophages. *Infect. Immun.* 2010, 78(4), 1797–1806.
7. Корнева А.В., Николаев В.Б., Ястремская К.Ю. и др. Результаты изучения иммуногенной активности клеточных оболочек *Francisella tularensis* разных подвигов (сообщение 1). *Эпидемиол. вакцинопрофилактика*, 2014, 4(77), 73–77.
8. Волох О.А., Шепелёв И.А., Фирстова В.В. и др. Оценка иммунобиологической активности препаратов С-комплекса туляремийного микроба, как перспективного компонента химических вакцин. *Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол.* 2007, 3, 16–21.
9. Кузнецова Е.М., Волох О.А., Смолькова Е.А. и др. Иммунобиологические свойства антигенных комплексов туляремийного микроба. *Проблемы особо опасных инфекций*, 2011, 109, 46–49.
10. Кузнецова Е.М., Волох О.А., Шепелев И.А., Никифоров А.К. Компонентный состав протективного антигенного комплекса туляремийного микроба. *Мол. генет. микробиол. и вирусол.*, 2012, 3, 22–25.
11. Волох О.А., Кузнецова Е.М., Смолькова Е.А. и др. Экспериментальный препарат для специфической профилактики туляремии. *Пробл. особо опасных инф.* 2013, 2, 73–77.
12. Хлебников В.С., Головлев И.Р., Чугунов А.М. и др. Защитные свойства внешней мембраны *Francisella tularensis* при экспериментальной инфекции морских свинок. *Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол.*, 1994, 1, 84–88.
13. Лапин А.А., Павлов В.М., Мокриевич А.Н. и др. Простая жидкая питательная среда для молекулярно-

- генетических исследований *Francisella tularensis*. Пробл. особо опасных инф. 2009, 4, 66–70.
14. Towbin H., Staehelin T., Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrilamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Sci. USA*. 1979, 76(9), 4350–4354.
  15. Hermanson G.T. Bioconjugate techniques. San Diego, CA: Academic Press, 1996, 416.
  16. Хлебников В.С., Головлев И.Р., Тохтамышева Н.В. и др. Определение антигенной детерминанты превентивных моноклональных антител, специфичных к липополисахариду *Francisella tularensis*. Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. 1993, 1, 83–88.
  17. Мокриевич А.Н., Кондакова А.Н., Валаде Э. и др. Биологические свойства и строение липополисахарида вакцинного штамма *Francisella tularensis*, полученного при инаktivации гена системы «чувства кворума» *qseC*. Биохимия, 2010, 75(4), 539–548.
  18. Мокриевич А.Н., Вахрамеева Г.М., Титарева Г.М. и др. Получение и иммунобиологические свойства вакцинного штамма туляремийного микроба без одной копии гена *iglC* и без гена *resA*. Мол. генет, микробиол. и вирусол., 2015, 33(3), 33–39.
  19. Фирстова В.В., Павлов В.М., Горбатов А.А., Комбарова Т.И. и др. Формирование антитуляремийного клеточного и гуморального иммунного ответа, индуцированного у мышей *F. tularensis* 15 НИИЭГ. Иммунология, 2014, 35(3), 147–150.
  20. Павлов В.М., Дятлов И.А. Молекулярно-генетические исследования бактерий рода *Francisella* и их прикладное значение М. 2012. 121–130.
  21. Oyston P.C. *Francisella tularensis* vaccines. *Vaccine*, 2009, 27(Suppl 4:D), 48–51. doi: 10.1016/j.vaccine.2009.07.090
  22. Isherwood, K.E., Titball R.W., Davies D.H. et al. Vaccination strategies for *Francisella tularensis*. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2005, 57(9), 1403–1414.

## Antigenic and Immunogenic Characteristics of Dissolved, Adsorbed and Microencapsulated Formulations of Acid-Insoluble Complex from *Francisella tularensis* 15 NIIG Strain

A.N. SOMOV\*, T.B. KRAVCHENKO, V.M. PAVLOV, G.M. VAKHRAMEEVA, T.I. KOMBAROVA, R.I. MIRONOVA, V.V. FIRSTOVA, O.V. KALMANTAeva, S.S. VETCHININ, and A.N. MOKRIEVICH

The State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, 142279, Obolensk, Moskovskaya Oblast, Russia

e-mail: somov@obolensk.org\*

Received December 27, 2016

Accepted May 10, 2017

**Abstract**—The results of the assessment of antigenic and immunogenic characteristics of acid-insoluble antigenic complex (AIAC) using experimental tularemia in mice as a model are represented. The AIAC preparations were isolated from the *Francisella tularensis* 15 NIIEG vaccine strain and were then subjected to the adsorption on or microencapsulation in solid carriers. Proteins, nucleic acids and lipopolysaccharides occurred in the complex in a mass percentage ratio of 49:25:5. Six immunodominant proteins were found in the AIAC, three of which were presented in higher concentration due to the selective extraction of these components during the isolation. The immunization of line BALB/c mice with acid-insoluble antigen complex in the form of colloid solution or as solid particulate formulations (as microcapsules or adsorbed on aluminum hydroxide gel) was capable of properly inducing the humoral immune response. However, the obtained response was not sufficient to fully protect mice from the natural *F. tularensis* strain infection owing to the weak specific activation of the immune system cellular component.

**Key words:** acid-insoluble antigen complex, aluminum hydroxide gel, *F. tularensis*, microencapsulation, subunit vaccine.

**Acknowledgements**—The work was performed within the NIR 048 framework «Studies on the Pathogenesis and Immunogenesis Mechanisms of the Tularemia Infection and Monitoring of the Agent Circulation in the Separate Regions of the RF», a part of the Rospotrebnadzor Research Program for 2016–2020 «The Problem-Oriented Scientific Studies in the Area of the Epidemiological Control of the Infectious and Parasitic Diseases».

doi: 10.21519/0234-2758-2017-33-5-23-34