ИЗУЧЕНИЕ АДЪЮВАНТНЫХ СВОЙСТВ НАНОЧАСТИЦ ИЗ ЭКСТРАКТА БЕРЕСТЫ ПРИ ИММУНИЗАЦИИ МИНИ-СВИНЕЙ СВЕТЛОГОРСКОЙ ПОПУЛЯЦИИ

А.Г. Берзина^{1,*}, Н.В. Станкова², А.П. Каплун³, А.А. Буркова³, Н.Б. Гамалея¹

¹ Национальный научный центр наркологии — филиал
ФГБУ «Национальный медицинский научно-исследовательский центр психиатрии и наркологии
им. В.П. Сербского» Минздрава России
119034, Российская Федерация, Москва, Кропоткинский пер., 23

² ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России»
143442, Российская Федерация, Московская обл., Красногорский р-н, п. Светлые горы, 1

³ ФГБОУ ВО «МИРЭА — Российский технологический университет»
119454, Российская Федерация, Москва, просп. Вернадского, 78

Проведено исследование по изучению адъювантных свойств наночастиц, выделенных из сухого экстракта бересты. Эксперименты по иммунизации проводились на мини-свиньях светлогорской популяции — биомодели человека. Животные получали две подкожные инъекции антигена в дозе 0,1 мг/кг с интервалом 14 дней. Добавление в пробы иммуногена водной суспензии наночастиц до конечной концентрации 0,5 мг/мл приводило к усилению иммунного ответа. Побочных эффектов не наблюдалось. Титры антител в сыворотках крови на 60-й и 90-й день от начала иммунизации были сопоставимы с теми, что были получены в аналогичных условиях с применением адъюванта Фрейнда (1:4000).

Ключевые слова: адъюванты, бетулин, иммунный ответ, мини-свиньи, наночастицы

Конфликт интересов: авторы заявили об отсутствии конфликта интересов.

Для цитирования: Берзина А.Г., Станкова Н.В., Каплун А.П., Буркова А.А., Гамалея Н.Б. Изучение адъювантных свойств наночастиц из экстракта бересты при иммунизации мини-свиней светлогорской популяции. *Биомедицина*. 2021;17(3E):133–138. <https://doi.org/10.33647/2713-0428-17-3E-133-138>

Поступила 05.04.2021

Принята после доработки 02.06.2021

Опубликована 20.10.2021

INVESTIGATION OF THE ADJUVANT PROPERTIES OF NANOPARTICLES FROM A BIRCH BARK EXTRACT USED FOR IMMUNIZATION OF MINI PIGS OF THE SVETLOGORSK POPULATION

Asya G. Berzina^{1,*}, Nataliya V. Stankova², Alexandr P. Kaplun³, Anna A. Burkova³,
Nataliya B. Gamaleya¹

¹ National Scientific Center of Narcology — Branch of the National Medical Research Center of Psychiatry
and Narcology named after V.P. Serbskiy of the Ministry of Health Care of Russia
119034, Russian Federation, Moscow, Kropotkinskiy lane, 23

² Scientific Center of Biomedical Technologies of the Federal Medical and Biological Agency of Russia
143442, Russian Federation, Moscow Region, Krasnogorsk District, Svetlye Gory Village, 1

³ MIREA — Russian Technological University
119454, Russian Federation, Moscow, Vernadskogo Avenue, 78

The adjuvant properties of nanoparticles derived from a dry birch bark extract were studied. Immunization experiments were carried out on mini pigs of the Svetlogorsk population, a human biomodel. Animals received two subcutaneous injections of the antigen at a dose of 0.1 mg/kg with an interval of 14 days. The addition of an aqueous suspension of nanoparticles to the immunogen samples up to a final concentration of 0.5 mg/ml led to an increase in the immune response. No side effects were observed. The antibody titers in blood sera on the 60th and 90th days from the start of immunization were comparable to those obtained under similar conditions using Freund's adjuvant (1:4000).

Keywords: adjuvants, betulin, immune response, mini pigs, nanoparticles

Conflict of interest: the authors declare no conflict of interest.

For citation: Berzina A.G., Stankova N.V., Kaplun A.P., Burkova A.A., Gamaleya N.B. Investigation of the Adjuvant Properties of Nanoparticles from a Birch Bark Extract Used for Immunization of Mini Pigs of the Svetlogorsk Population. *Journal Biomed.* 2021;17(3E):133–138. <https://doi.org/10.33647/2713-0428-17-3E-133-138>

Submitted 05.04.2021

Revised 02.06.2021

Published 20.10.2021

Введение

Разработка новых адъювантов для производства вакцинных препаратов является перспективным направлением современной биомедицины. Использование адъювантов позволяет уменьшить дозу антигена в вакцине, увеличить иммуногенность «слабых» антигенов. В последние годы в нашей стране ведётся работа по созданию экспериментальных образцов вакцин для лечения и профилактики зависимости от наркотиков опийной группы. Наркотические вещества, используемые для выработки антител к опиатам, обладают слабой иммуногенностью. Для усиления иммунного ответа в экспериментах на животных в основном используется адъювант Фрейнда. Однако данный адъювант запрещён к применению на людях. По мнению многих исследователей, наиболее перспективными адъювантами являются наночастицы (НЧ) в силу того, что они эффективно поглощаются антиген-представляющими клетками. Антиген, связанный с НЧ, будет направленно поглощаться макрофагами, что приведёт к усилению иммунного ответа. В Российском технологическом университете из экстракта бересты были получены препараты наночастиц — САНЧ (сферические аморфные наночастицы диаметром около 150 нм),

запатентованный при разработке противовирусных вакцин [4], а также новый препарат — ПНЧ (палочковидные наночастицы размером около 20×800 нм) [3], представленные на рисунке. В качестве биомодели для исследований адъювантных свойств таких наночастиц нами были использованы мини-свиньи светлогорской популяции [1].

Цель работы — изучить адъювантные свойства препаратов наночастиц из экстракта бересты при иммунизации мини-свиней светлогорской популяции в сравнении с адъювантом Фрейнда.

Материалы и методы

В качестве антигена для выработки антител использовали 6-гемисукцинильное производное морфина — 6-ГСМ, конъюгированное с бычьим сывороточным альбумином (БСА) по ранее описанной методике [2]. Оценка иммуногенных свойств наночастиц была осуществлена на мини-свиньях светлогорской популяции на базе ФГБУН НЦБМТ ФМБА России. Ранее мини-свиньи были использованы нами в качестве биомодели для изучения иммунного ответа к различным антигенам [1]. Эксперимент проводился на 8 поросятах из одного помета (4 самки и 4 самца в возрасте 6 мес.):

4 животных иммунизировали антигеном 6-ГСМ-БСА в дозе 0,1 мг/кг с добавлением САНЧ и ПНЧ в пробы антигена до конечной концентрации 0,5 мг/мл. Для сравнения 6-ГСМ-БСА вводился в той же дозе с добавлением адъюванта Фрейнда («Sigma»). Контрольные животные получали антиген без адъюванта. Схема иммунизации включала 2 инъекции (в/м и п/к) с интервалом 14 дней. На протяжении всего периода иммунизации у животных измеряли ректальную температуру и проводили контрольное взвешивание.

Титр антител в сыворотке крови животных определяли на 60-й и 90-й день от начала иммунизации с помощью непрямого метода ИФА, используя 2-фенилазо-производное морфина, конъюгированное с лизоцимом (ФАМ-лиз) в качестве антигена на твёрдой фазе. Кроме того, из всех сывороток до и после иммунизации выделялась суммарная фракция иммуноглобулинов с помощью метода двукратного осаждения ПЭГ-6000.

Концентрацию белка в иммуноглобулиновых фракциях выделенных образцов определяли спектрофотометрически при длине волны 280 нм.

Результаты и их обсуждение

Проверка влияния вводимых адъювантов на физиологическое состояние животных показала, что побочные эффекты у поросят наблюдались лишь при использовании адъюванта Фрейнда — повышение температуры до 40°C, воспаление на месте инъекции, а также плохая прибавка в весе в период иммунизации (45 дней). При использовании препаратов САНЧ и ПНЧ в качестве адъювантов побочных эффектов не наблюдалось.

Применение адъювантов САНЧ и ПНЧ приводило к увеличению содержания иммуноглобулинов в сыворотках крови так же, как и в случае использования адъюванта Фрейнда (табл. 1).

Рис. Электронная микрофотография наночастиц из экстракта бересты. В препарате видны два вида наночастиц: САНЧ и ПНЧ. Негативное контрастирование 1% уранилацетатом (ув. $\times 250\,000$).

Fig. An electron micrograph of nanoparticles from a birch bark extract. Two types of nanoparticles are visible in the preparation: spherical amorphous nanoparticles and rod-shaped nanoparticles. Negative contrasting with 1% uranyl acetate (magn. $\times 250,000$).

Измерение титров антител к морфину при проверке на ФАМ-лиз непрямым методом ИФА на 60-й день от начала иммунизации показало, что без применения адъювантов специфические антитела присутствуют в сыворотках крови в очень низком титре (1:250) (табл. 2). Титры специфических антител у поросят, иммунизированных антигеном в смеси с САНЧ и ПНЧ, близки к титрам в случае использования адъюванта Фрейнда (1:4000). Интересно, что самки, иммунизированные антигеном с добавлением наночастиц, показали лучшие результаты, чем самцы. Через 3 мес. от начала иммунизации титры антител сохранялись практически на прежнем уровне.

Ранее, при получении первичных антител к двум производным морфина на мини-свиньях с использованием адъюванта Фрейнда, нами были получены сыворотки с более высокими титрами (1:25 000). По-видимому, на это влияло использование для иммунизации более высоких доз вводимого антигена — от 0,5 до 1 мг/кг. Однако в данном исследовании нами была специально выбрана более низкая доза — 0,1 мг/кг, для того,

Таблица 1. Содержание иммуноглобулинов в сыворотке крови поросят до и после цикла иммунизации с экспериментальными адъювантами

Table 1. Contents of immunoglobulins in the blood serum of piglets before and after the immunization cycle with experimental adjuvants

№ животного, пол	Экспериментальный адъювант	Содержание иммуноглобулинов до иммунизации, мг/мл	Содержание иммуноглобулинов после иммунизации (на 60-е сут.), мг/л
Самцы			
931	без адъюванта	17,0	18,0
933	адъювант Фрейнда	17,5	25,8
935	САНЧ	17,3	25,2
937	ПНЧ	17,6	28,8
Самки			
948	без адъюванта	17,4	18,6
950	адъювант Фрейнда	18,0	25,3
952	САНЧ	17,4	27,6
954	ПНЧ	17,5	27,9

Таблица 2. Титр специфических антител в сыворотках крови мини-свиней при использовании экспериментальных адъювантов

Table 2. The titer of specific antibodies in the blood serum of minipigs using experimental adjuvants

№ животного, пол	Экспериментальный адъювант	Титры антител при проверке в ИФА	
		на 60-й день от начала иммунизации	на 90-й день от начала иммунизации
Самцы			
931	без адъюванта	1:250	1:500
933	адъювант Фрейнда	1:4000	1:4000
935	САНЧ	1:1000	1:1000
937	ПНЧ	1:2000	1:2000
Самки			
948	без адъюванта	1:250	1:500
950	адъювант Фрейнда	1:4000	1:2000
952	САНЧ	1:4000	1:4000
954	ПНЧ	1:4000	1:4000

чтобы уловить различия в образовании специфических антител к производному морфина у животных без применения и с применением различных адъювантов к одному и тому же антигену — 6-ГСМ-БСА.

Закключение

Таким образом, проведённые исследования показывают, что наночастицы, полученные из сухого экстракта бересты, — САНЧ и ПНЧ, обладают адъювантными

свойствами, усиливают иммунный ответ аналогично применяемому на животных адъюванту Фрейнда и не оказывают негативного влияния на состояние животных. В перспективе наночастицы могут найти применение при разработке вакцинных препаратов для людей. Однако необхо-

димо проведение дальнейших доклинических исследований, в частности, с целью подбора оптимальных концентраций САНЧ и ПНЧ в сочетании с различными вводимыми антигенами при создании фармацевтических композиций вакцинных препаратов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | REFERENCES

1. Берзина А.Г., Станкова Н.В., Ульянова Л.И., Гамалея Н.Б., Капанадзе Г.Д. Использование мини-свиней светлогорской популяции в качестве биомодели для изучения иммунного ответа на введение иммуноглобулина G лошади. *Биомедицина*. 2016(4):47–53. [Berzina A.G., Stankova N.V., Ul'yanova L.I., Gamaleya N.B., Kapanadze G.D. Ispol'zovanie mini-svinej svetlogorskoj populjacji v kachestve biomodeli dlja izuchenija immunogo otveta na vvedenie immunoglobulina G loshadi [Svetlogorsk mini-pigs as a biomodel for studying the immune response of the horse immunoglobulin G]. *Biomeditsina [Journal Biomed]*. 2016(4):47–53. (In Russian)].
2. Гамалея Н.Б., Берзина А.Г., Шестаков К.А., Капанадзе Г.Д., Ревякин А.О., Фокин Ю.В. Иммуноген для лечения и профилактики зависимости от опиатов. Патент РФ № 2548802. 2015. [Gamaleya N.B., Berzina A.G., Shestakov K.A., Kapanadze G.D., Revyakin A.O., Fokin Yu.V. *Immunogen dlja lechenija i profilaktiki zavisimosti ot opiatov [Immunogen for the treatment and prevention of opiate dependence]*. Patent N 2548802 of the Russian Federation. 2015. (In Russian)].
3. Каплун А.П., Безруков Д.А., Попенко В.И., Швеиц В.И. Сферические аморфные наночастицы из тритерпеноидов бересты — новый тип субмикронных средств для доставки лекарственных субстанций. *Биофармацевтический журнал*. 2011;3(2):28–40. [Kaplun A.P., Bezrukov D.A., Popenko V.I., Shvets V.I. Sfericheskie amorfnye nanochasticy iz triterpenoidov beresty — novyj tip submikronnyh sredstv dlja dostavki lekarstvennyh substancij [Spherical amorphous nanoparticles from birch bark triterpenoids as a new type of submicron delivery vehicle of medicinal substances]. *Biopharmaceutical journal*. 2011;3(2):28–40. (In Russian)].
4. Красильников И.В., Николаева А.М., Иванов А.В. Способ получения адъюванта для вирусных вакцин. Патент РФ № 2545714. 2015. [Krasil'nikov I.V., Nikolaeva A.M., Ivanov A.V. *Sposob polucheniya ad'juvanta dlja virusnyh vakcin [A method of obtaining an adjuvant for viral vaccines]*. Patent N 2545714 of the Russian Federation. 2015. (In Russian)].

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ | INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Берзина Ася Григорьевна*, к.б.н., Национальный научный центр наркологии — филиал ФГБУ «Национальный медицинский научно-исследовательский центр психиатрии и наркологии имени В.П. Сербского» Минздрава России;

e-mail: berzina07@mail.ru

Станкова Наталия Владимировна, к.б.н., ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России»;

e-mail: sinayva@yandex.ru

Каплун Александр Петрович, д.х.н., проф., ФГБОУ ВО «МИРЭА — Российский технологический университет»;

e-mail: alex.kaplun@mail.ru

Asya G. Berzina*, Cand. Sci. (Biol.), National Scientific Center of Narcology — Branch of the National Medical Research Center of Psychiatry and Narcology named after V.P. Serbskiy of the Ministry of Health Care of Russia;

e-mail: berzina07@mail.ru

Nataliya V. Stankova, Cand. Sci. (Biol.), Scientific Center of Biomedical Technologies of the Federal Medical and Biological Agency of Russia;

e-mail: sinayva@yandex.ru

Alexandr P. Kaplun, Dr. Sci. (Chem.), Prof., MIREA — Russian Technological University;

e-mail: alex.kaplun@mail.ru

Буркова Анна Андреевна, ФГБОУ ВО «МИРЭА — Российский технологический университет»;

Гамалея Наталия Борисовна, д.м.н., проф., Национальный научный центр наркологии — филиал ФГБУ «Национальный медицинский научно-исследовательский центр психиатрии и наркологии имени В.П. Сербского» Минздрава России;

e-mail: natgam@mail.ru

Anna A. Burkova, MIREA — Russian Technological University;

Nataliya B. Gamaleya, Dr. Sci. (Med.), Prof., National Scientific Center of Narcology — Branch of the National Medical Research Center of Psychiatry and Narcology named after V.P. Serbskiy of the Ministry of Health Care of Russia;

e-mail: natgam@mail.ru

* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author