

## Изучение иммунного ответа у мини-свиней светлогорской популяции к двум производным морфина

А.Г. Берзина<sup>1</sup>, Л.И. Ульянова<sup>1</sup>, Н.Б. Гамалея<sup>1</sup>, Н.В. Станкова<sup>2</sup>,  
Г.Д. Капанадзе<sup>2</sup>

<sup>1</sup> – ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр психиатрии и наркологии им. В.П. Сербского» Минздрава России, Москва

<sup>2</sup> – ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России», Московская область

Контактная информация: д.м.н. Гамалея Наталья Борисовна, [natgam@mail.ru](mailto:natgam@mail.ru),  
к.б.н. Станкова Наталья Владимировна, [sinayva@yandex.ru](mailto:sinayva@yandex.ru)

---

Предложена схема иммунизации мини-свиней светлогорской популяции производными морфина, конъюгированными с бычьим сывороточным альбумином. Показана специфичность к морфину выделенных из иммунной сыворотки антител. Антитела в крови испытуемого животного сохранялись в течение года. Наблюдения за состоянием животного, иммунизированного производными морфина, не выявили отклонений в его развитии и психоэмоциональном состоянии.

**Ключевые слова:** антитела, биомодель, иммунный ответ, мини-свиньи, производные морфина.

---

### Введение

В свете современных представлений в наркологической практике актуальными остаются усилия, направленные на поиск методов, средств лечения и профилактики наркомании. Важными целями в борьбе с наркотической зависимостью является достижение стойкой стабильной ремиссии и предупреждение рецидивов заболевания. Последние достижения зарубежных исследователей в этой области показали, что значительного эффекта в лечении и профилактике наркозависимости можно достичь иммунотерапевтическими методами с применением вакцин, представляющих собой иммуногены – конъюгированные с белками производные морфина, способствующие выработке антител, нейтрализующих наркотик. Та-

кие антитела могут быть получены при иммунизации лабораторных животных этими иммуногенами. Ряд исследований в этой области проводили на грызунах с целью понимания того, каким образом наличие антиморфиновых антител в крови животных может влиять на снижение зависимости от опиатов [3, 6]. Ранее было показано, что катаболизм антител (иммуноглобулинов класса G) у грызунов значительно отличается по длительности от катаболизма антител у человека – 3-4 дня у крысы и 21 день у человека [5].

В последние годы в нашей стране в качестве биомодели человека для изучения необходимых состояний и тонких метаболических сдвигов стали успешно применяться лабораторные мини-свиньи светлогорской популяции. В связи

с этим нами было принято решение изучить динамику накопления антител к производным морфина на этой модели.

**Цель работы** – изучить иммунный ответ у мини-свиней на введение антигена, представляющего собой смесь двух производных морфина, конъюгированных с белком, а также получить антитела к этим производным для дальнейшего изучения их биологических свойств и проследить динамику накопления антител в крови мини-свиньи после одного цикла иммунизации в течение одного года.

### Материалы и методы

Для получения антител к морфину в работе были использованы ранее выделенные нами антигены – конъюгаты производных морфина с бычьим сывороточным альбумином (БСА): 6-гемисукцинильным (ГСМ) и 3-О-карбоксиметильным (КММ) эфирами. При постановке иммуноферментного анализа (ИФА) использовали 2-фенил-азо-производное морфина (ФАМ), конъюгированное с гетерологичным бел-

ком-лизоцимом, методика синтеза описана в патенте [3]. Работа по изучению влияния дозы антигена на титр иммунных сывороток к производным морфина проводилась путем иммунизации 2-х мини-свиней светлогорской популяции по предложенной нами схеме (табл.).

Забор крови для тестирования на наличие антител осуществляли из краниальной полой вены. Сыворотки крови тестировали непрямой методом ИФА, используя в качестве антигена на твердой фазе ФАМ-лизоцим. Очистку IgG из иммунной сыворотки, истощенной от антител к БСА, проводили с помощью аффинной хроматографии с использованием протеин А-агарозы “Sigma” [2, 4]. В качестве элюирующего буфера использовали 0,1 М глицин – HCl буфер, pH 3,0; pH р-ра сошедших с колонки аффинных антител доводили до нейтрального добавлением 0,2 М Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> и диализовали в течение ночи при +4°C против забуференного физ. р-ра (ЗФР). Полученные препараты IgG тестировали с помощью непрямого метода ИФА [1] для сравнения их антительной активности в реакции с антигеном

Таблица

Схема иммунизации мини-свиней

Пол, возраст, масса	Вводимый антиген	Доза, мг/мл	Способ введения антигена		
			1-я инъекция*	2-я инъекция*	3-я инъекция*
1. Мини-свинья (№ 109, самец, 5 мес., 9 кг) 2. Мини-свинья (№ 689, самец, 5 мес., 10 кг)	КММ-БСА + ГСМ-БСА	1  0,3	Внутримышечно в 2 точки задних конечностей в физ. р-ре с ПАФ (1:1)	Подкожно в 2 точки в область шейных лимфоузлов в физ. р-ре с НАФ (1:1)	Подкожно в 2 точки в область шейных лимфоузлов в физ. р-ре с НАФ (1:1)

*Примечание:* \* – инъекции проводили с интервалом 14 дней; ПАФ – полный адьювант Фрейнда, НАФ – неполный адьювант Фрейнда.

ФАМ-лизоцим. В качестве антивидового конъюгата использовали антисвиной иммунопероксидазный конъюгат “Sigma” в разведении 1:4000. Субстратом для ферментативной реакции служила смесь ортофенилендиамина – ОФД “Sigma” с концентрацией 4 мг/мл и 0,02%  $H_2O_2$ . Постановку ИФА проводили в планшетах фирмы «Nunc». Определение титра антител в сыворотке крови свиней осуществляли на 9-й, 14-й и 21-й день от последней инъекции. У мини-свиньи № 689 с целью изучения динамики антител заборы крови проводили на протяжении года – через 2, 4, 7, 9 и 12 мес. от начала иммунизации, после чего животному была сделана одна бустерная инъекция антигена в дозе 0,1 мг/кг.

Физиологическое состояние животных оценивали визуально, проводили взвешивание в начале эксперимента и через каждые 6 мес., а также измеряли ректальную температуру.

### Результаты и их обсуждение

В ходе выполнения работы были подобраны оптимальные условия определения свиных антител к производным морфина методом ИФА (концентрация антигена – ФАМ-лизоцим для адсорбции на твердой фазе составила 5 мкг/мл, разведение антивидового конъюгата – 1:4000, концентрация субстрата ОФД – 4 мг/мл). Определение титра специфических антител к морфину в сыворотках мини-свиней №№ 109 и 689 после одного цикла иммунизации (на 9-й день от последней инъекции) показало, что антитела обнаруживаются в сыворотках в одинаковых разведениях 1:25600 (рис. 1), несмотря на то, что животные получали разные дозы антигена.

Дальнейшее изучение содержания антител к морфину, проводимое на мини-свинье № 689, показало, что через 4 мес. от начала иммунизации титр антиморфиновых антител достиг максимума – 1:102400. Ранее нами было

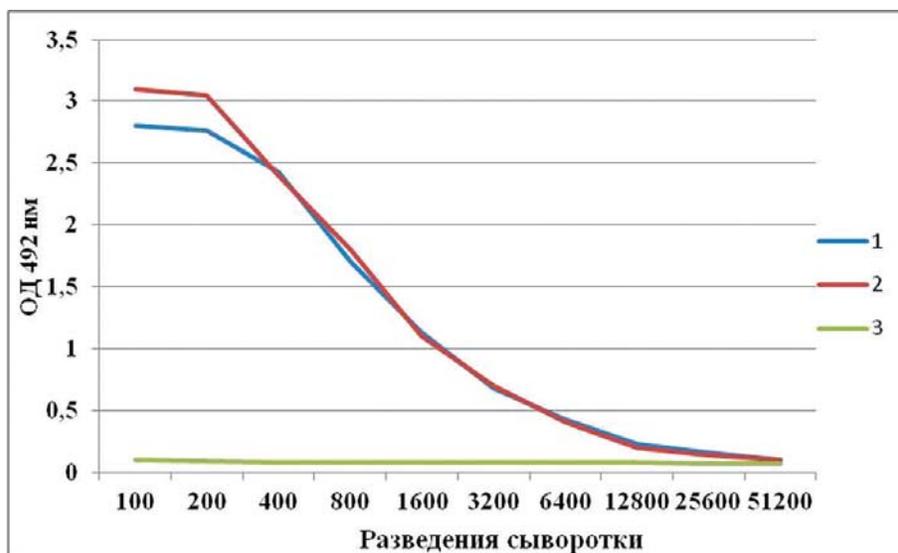


Рис. 1. Титры антисывороток мини-свиней, иммунизированных суммарным антигеном КММ-БСА + ГСМ-БСА: 1 – доза антигена 1 мг/кг; 2 – доза антигена 0,3 мг/кг; 3 – сыворотка неиммунной свиньи.

показано [2], что в результате курса иммунизации кроликов конъюгатами производных морфина с БСА (доза антигена 0,5 мг/кг) можно получить сыворотки с титрами 1:51200 – 1:102400. Иммунизация мини-свиней по предложенной нами схеме позволяет получить иммунные сыворотки к производным морфина с аналогичными титрами.

Из сывороток с максимальными титрами были выделены иммуноглобулины класса G. Проверка выделенных IgG на наличие антительной активности к производным морфина с помощью непрямого метода ИФА показала положительную реакцию с ФАМ-лизоцимом, что свидетельствует о том, что антитела, присутствующие во фракции IgG, специфичны к морфину.

Результаты сравнения препаратов IgG, выделенных до и после очистки, представлены на рис. 2.

Как видно из рис. 2, оптическая плотность при определении антител во фракции IgG после очистки повышается, что свидетельствует о повышении специфичности выделенного препарата.

Результаты тестирования сывороток мини-свиньи № 689 на присутствие антител к производным морфина, полученных на протяжении одного года, представлены на рис. 3. При определении антител с помощью непрямого метода ИФА оптическая плотность (ОП<sub>492</sub>) окрашенного продукта ферментативной реакции зависит от концентрации антител в образце (см. рис. 2). При анализе сывороток (рис. 1) на основании величины оптической плотности в результате реакции также можно судить о количественном содержании антител. Ввиду того, что кривая титрования сывороток имеет S-образный

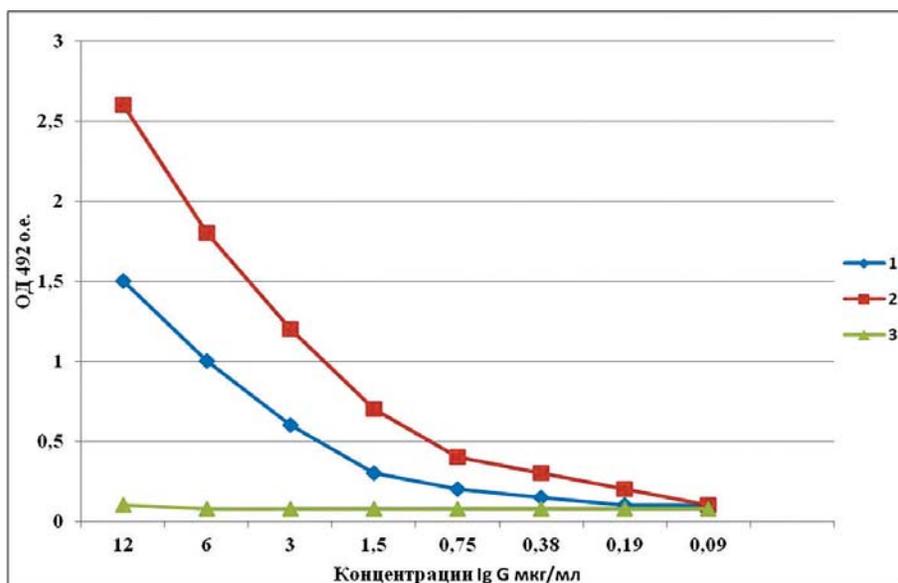


Рис. 2. Антительная активность препаратов IgG, выделенных с помощью аффинной хроматографии на протеин А – агарозе: 1 – суммарная фракция Ig после осаждения полиэтиленгликолем-6000 (до аффинной очистки), 2 – фракция IgG после очистки, 3 – IgG неиммунизированной свиньи.

характер, проводить сравнение сывороток по количественному содержанию антител можно лишь в тех разведениях, при которых на кривой имеется линейная зависимость. В связи с этим для сравнения сывороток, полученных от мини-свиньи № 689 в различные интервалы времени, нами использовалось разведение сыворотки 1:2000.

Из рис. 3 видно, что оптическая плотность продукта реакции при анализе сывороток, взятых в одном и том же разведении (1:2000), достигает максимума на 4-й мес. от начала иммунизации мини-свиньи. Далее концентрация антител в пробах постепенно снижается. Согласно результатам исследований, присутствие антиморфиновых антител сохраняется до 12-ти мес. Определение титров антител в иммунных сыворотках также показало, что после одного цикла иммуниза-

ции титр антител достигает максимума (1:102400) на 4-й мес. от начала иммунизации, далее титр антиморфиновых антител постепенно снижается до 1:25600 (через 7 мес.) и до 1:6800 (через 12 мес.). При введении всего одной бустерной инъекции поросенку № 689 через 1 год (в дозе 0,1 мг/кг) концентрация антител в его крови повысилась, о чем свидетельствует повышение ОП почти в 2 раза (рис. 3). Титр антител также увеличился (до 1:25600).

По наблюдениям за состоянием и поведением животного № 689 в течение года видимых изменений не обнаружено. Хряк имел хороший аппетит, нормально общался со сверстниками. Состояние по живой массе и температуре тела было без отклонений. Вид бодрый, кожа чистая, щетина ровная, блестящая, походка твердая, глаза ясные. Сердцебиение и дыхание были нормальными. В

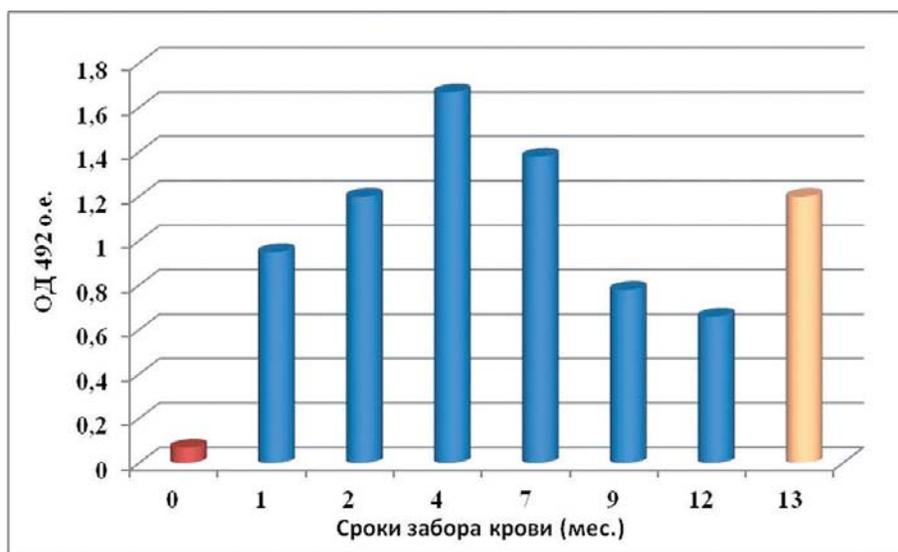


Рис. 3. Изменение значений ОП<sub>492</sub> при тестировании иммунной сыворотки мини-свиньи:

- – до начала иммунизации,
- – после иммунизации на протяжении года,
- – через год после одной бустерной инъекции.



Рис. 4. Хряк № 689.

психоэмоциональном состоянии изменений также не выявлено, хряк не проявлял агрессию и не впадал в депрессию (рис. 4).

### Заключение

Таким образом, полученные нами результаты по иммунизации мини-свиней светлогорской популяции двумя производными морфина, конъюгированными с БСА, свидетельствуют о высокой иммуногенности данных антигенов. Уменьшение дозы от 1 до 0,3 мг/кг не влияло на результаты иммунизации. После одного цикла иммунизации, состоящего из трех инъекций, титр специфических антител к производным морфина в сыворотках составил 1:100000. Содержание антител у иммунного животного сохранялось высоким до полугода, затем титр антител постепенно снижался (к концу года – до 1:6400). Однократная бустерная инъекция антигена в дозе 0,1 мг/кг позволила повысить содержание антител в крови мини-свиньи почти в 4 раза (если судить по титрам антител). Наличие антиморфиновых антител не отражалось негативным образом на самочувствии животного.

### Список литературы

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 IgG лошади // Биомедицина. – 2016. – № 4. – С. 47-53.
2. Берзина А.Г., Гамалея Н.Б., Сергеева В.Е., Трофимов А.В., Ульянова Л.И. Получение поликлональных и моноклональных антител к двум производным морфина // Вопр. наркологии. – 2016. – № 11-12. – С. 39-53.
3. 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 на изобретение RU 2 548 802 от 28.11.2013.
4. Дин П., Джонсон У., Мидл Ф. Аффинная хроматография. – М.: Мир, 1988. – 278 с.
5. Кульберг А.Я. Регуляция иммунного ответа. – М.: Медицина, 1986. – 224 с.
6. Q.-Q. Li, Y.-X. Luo, C.-Y. Sun, Y.-X. Xue, et al. A morphine/heroin vaccine with new hapten design attenuates behavioral effects in rats // J. of Neurochemistry. – 2011. – No. 119. – Pp. 1271-1281.

### References

1. Berzina A.G., Stankova N.V., Ulyanova L.I., Gamaley N.B., Kapanadze G.D. Ispol'zovanie mini-svinej svetlogorskoj populjacji v kachestve biomodeli dlya izucheniya immunogo otveta na vvedenie IgG loshadi [Use of mini pigs of the Svetlogorsk population as a biomodel for studying the immune response to the

- introduction of IgG horses]. *Biomedicine*. 2016. No. 4. Pp. 47-53. (In Russian).
2. *Berzina A.G., Gamaleyeva N.B., Sergeeva V.E., Trofimov A.V., Ul'yanova L.I.* Poluchenie poliklonal'nykh i monoklonal'nykh antitel k dvum proizvodnym morfina [Preparation of polyclonal and monoclonal antibodies to two derivatives of morphine]. *Vopr. narkologii* [Narcology questions]. 2016. No. 11-12. Pp. 39-53. (In Russian).
  3. *Gamaleyeva N.B., Berzina A.G., Shestakov K.A., Kapanadze G.D., Revyakin A.O., Fokin Yu.V.* Immunogen dlya lecheniya i profilaktiki zavisimosti ot opiatov [Immunogen for the treatment and prevention of dependence on opiates]. Patent for invention RU 2 548 802 of 28.11.2013. (In Russian).
  4. *Din P., Dzhonson U., Midl F.* Affinnaya khromatografiya [Affine chromatography]. Moscow: Mir, 1988. 278 p. (In Russian).
  5. *Kul'berg A.Ya.* Regulyaciya immunnogo otveta [Regulation of the immune response]. Moscow: Medicina, 1986. 224 p. (In Russian).
  6. *Q.-Q. Li, Y.-X. Luo, C.-Y. Sun, Y.-X. Xue, et al.* A morphine/heroin vaccine with new hapten design attenuates behavioral effects in rats. *J. of Neurochemistry*. 2011. No. 119. Pp. 1271-1281.

## The study of the immune response in mini-pigs of the Svetlogorsk population to two morphine derivatives

A.G. Berzina, L.I. Ul'yanova, N.B. Gamaleyeva, N.V. Stankova,  
G.D. Kapanadze

A scheme for immunizing mini-pigs of the Svetlogorsk population with morphine derivatives conjugated to bovine serum albumin is proposed. Morphine specificity of antibodies isolated from the immune serum is shown to be specific. Antibodies in the blood of the test animal persisted for a year. Observations of the condition of the animal immunized with morphine derivatives did not reveal any deviations in its development and psychoemotional state.

**Key words:** antibodies, biomodel, immune response, mini-pigs, morphine derivatives.