

ЭФФЕКТИВНОСТЬ МАСЛЯНЫХ И ПОЛИЭЛЕКТРОЛИТНЫХ АДЪЮВАНТОВ ПРИ ГИПЕРИММУНИЗАЦИИ КРОЛИКОВ ДИМЕТИЛСУЛЬФОКСИДНЫМ АНТИГЕНОМ ПСЕВДОТУБЕРКУЛЕЗНОГО МИКРОБА

Маниесон Виктор Эммануэль, аспирант кафедры «Микробиология и биотехнология»
Ивашенко Сергей Владимирович, кандидат биологических наук, доцент кафедры «Микробиология и биотехнология»

Хапцев Заур Юрьевич, кандидат биологических наук, доцент кафедры «Микробиология и биотехнология»

ФГБОУ ВО «Саратовский государственный университет генетики, биотехнологии и инженерии им. Н.И. Вавилова»

410600, г. Саратов, Театральная площадь, дом 1; тел.: 89085533057; e-mail: ivashenko-sv@mail.ru

Ключевые слова: *Yersinia pseudotuberculosis*, полный адъювант Фрейда, полиазолидинаммоний, диметилсульфоксид-антиген, гипериммунная сыворотка

Была проведена сравнительная оценка двух адъювантов: полиазолидинаммония, модифицированного гидрат-ионами йода (ПААГ) и полного адъюванта Фрейда (ПАФ). Оценка проводилась в процессе гипериммунизации кроликов смесью адъюванта и диметилсульфоксид-антигена (ДА) псевдотуберкулёзного микроба. Оба адъюванта стимулировали антителогенез и давали возможность получения гипериммунных сывороток с высоким титром антител. Однако ПАФ проявлял несколько более высокую активность (1:819200), чем ПААГ (1:409600). Наиболее ярко стимулирующий эффект адъювантов был выражен при малых дозах ДА (0,2-1 мг/кролика). Большие дозы антигена (16,0 мг/кролика) позволяли получать сыворотки с высоким титром антител без участия адъювантов. Стимулирующее действие комплексов ДА-ПААГ и ДА-ПАФ на антителогенез связано со скоростью и качеством дифференцировки лимфоцитов, и в меньшей степени с увеличением их числа. ПААГ показал слабо раздражающее действие на ткани организма в месте инъекции, а ПАФ – сильно раздражающее. Применение ПАФ привело к образованию в подкожной клетчатке кроликов множества болезненных уплотнений, которые не успевали рассасываться между иммунизациями. Таким образом, применение ПААГ в качестве адъюванта при гипериммунизации кроликов ДА псевдотуберкулёзного микроба является перспективным и позволяет избежать недостатков использования ПАФ.

Введение

Серологическая диагностика кишечного иерсиниоза и псевдотуберкулёза предполагает использование антителных диагностических препаратов, высокая концентрация специфических антител в которых достигается многократной иммунизацией, применением активных антигенов и адъювантов.

Одним из перспективных антигенов является диметилсульфоксид-антиген (ДА) иерсиний. Гипериммунные сыворотки, полученные в результате иммунизации ДА, имеют родовую специфичность к энтеропатогенным иерсиниям и могут быть использованы в диагностике. Однако в настоящее время остаётся открытым вопрос выбора адъюванта, который позволит наиболее полно стимулировать иммунную систему животного-продуцента и получать высокие титры специфических антител к данному антигену.

Адъюванты – это вещества или частицы, которые неспецифически стимулируют иммунную систему животного на выработку иммуноглобулинов. Популярностью пользуются

минеральные, масляные, растительные, корпускулярные, синтетические, цитокиновые, содержащие наночастицы, и комплексные адъюванты [1, 2, 3, 4].

Одним из наиболее эффективных и широко известных адъювантов является полный адъювант Фрейнда (ПАФ). По классификации он относится к масляно-корпускулярным адъювантам. Главным его недостатком является сильная местная воспалительная реакция, что затрудняет его использование при гипериммунизациях [5].

В качестве новых перспективных химических веществ с адъювантными свойствами признаны полиэлектролиты. Большой вклад в изучение адъювантных свойств полиэлектролитов внесли Р.В. Петров и Р.М. Хаитов [6]. Типичным представителем группы полиэлектролитов является полиазолидинаммоний. Это полимер, характеризующийся положительным зарядом. После модификации гидрат-ионами галогенов полиазолидинаммоний (ПААГ) приобретает ярко выраженные бактерицидные и фунгицид-

Таблица 1

Антительная активность гипериммунных кроличьих сывороток, полученных к ДА *Y. pseudotuberculosis* с использованием ПААГ и ПАФ

№ иммунизации	Наличие адьюванта	Титры антител полученных сывороток после иммунизации					
		Доза ДА, мг/кролика					
		0,2	1,0	2,0	4,0	8,0	16,0
до иммунизации	–	1:800	1:800	1:800	1:800	1:800	1:800
1	ФР	1:400	1:1600	1:1600	1:1600	1:3200	1:3200
	ПАФ	1:3200	1:6400	1:6400	1:6400	1:6400	1:6400
	ПААГ	1:1600	1:3200	1:3200	1:3200	1:3200	1:3200
2	ФР	1:1600	1:6400	1:6400	1:6400	1:12800	1:25600
	ПАФ	1:25600	1:51200	1:51200	1:51200	1:51200	1:51200
	ПААГ	1:12800	1:25600	1:25600	1:25600	1:25600	1:25600
3	ФР	1:3200	1:12800	1:12800	1:25600	1:51200	1:102400
	ПАФ	1:51200	1:102400	1:204800	1:204800	1:204800	1:204800
	ПААГ	1:25600	1:51200	1:102400	1:102400	1:102400	1:102400
4	ФР	1:6400	1:25600	1:25600	1:51200	1:102400	1:204800
	ПАФ	1:102400	1:204800	1:409600	1:409600	1:409600	1:409600
	ПААГ	1:51200	1:102400	1:204800	1:204800	1:204800	1:204800
5	ФР	1:6400	1:25600	1:51200	1:102400	1:204800	1:409600
	ПАФ	1:204800	1:409600	1:819200	1:819200	1:819200	1:819200
	ПААГ	1:51200	1:204800	1:409600	1:409600	1:409600	1:409600

ные свойства [7]. ПААГ характеризуется слабой токсичностью [8] и используется для консервации пищевых продуктов, растительного сырья, обработки воды бассейнов и оборудования. Перспективность его применения в качестве адьюванта при получении гипериммунных иерсиниозных сывороток изучалась с рядом антигенов, в т.ч. с ДА *Yersinia pseudotuberculosis* (*Y. pseudotuberculosis*) [9].

В данной статье нами проводится сравнительная оценка двух адьювантов в процессе получения гипериммунных сывороток к ДА *Y. pseudotuberculosis*: ПАФ и ПААГ.

Материалы и методы исследований

Для получения ДА использовали микробную культуру *Y. pseudotuberculosis* III О:3 сероварианта из музейной коллекции патогенных микроорганизмов ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб».

Методика получения ДА псевдотуберкулёзного микроба заключалась в обработке сухой ацетоновой микробной массы бактерий диметилсульфоксидом с последующим отбором жидкости, освобождением её от диметилсульфоксида и лиофилизацией.

Иммунизацию кроликов-самцов породы «Шиншилла» проводили подкожно вдоль спины в 3-4 точки в объёме 1 мл смеси. При использовании адьюванта соотношение адьюванта к раствору антигена составляло 1:1. Было проведено 5 иммунизаций с интервалом в 2 недели. Кровь для исследования брали из ушной вены в объёме 5 мл за сутки до введения антигена, начиная с 1 иммунизации.

Полученные гипериммунные сыворотки крови кроликов исследовали методом твёрдофазного непрямого ИФА на планшетах [10].

Количество лейкоцитов, лимфоцитов и гранулоцитов в крови кроликов определяли на гематологическом анализаторе.

В качестве антигенов для ИФА при исследовании сывороток использовали ДА *Y. pseudotuberculosis* III в концентрации 20 мкг/мл.

Результаты исследований

Для определения эффективности адьювантов кроликов разделили на 3 группы: 2 опытных и 1 контрольную. В опытных группах иммунизацию проводили смесью антигена с одним из адьювантов: ПААГ или ПАФ, а в контрольных группах адьювант заменяли физиологическим

раствором (ФР). Эффективность адьюванта определяли при разных дозах антигена. Для этого в каждой группе выделили по 6 подгрупп. Животных каждой из 6 подгрупп пятикратно иммунизировали одной из доз ДА: 0,2; 1; 2; 4; 8 или 16 мг/кролика. Полученные сыворотки крови исследовали при помощи ИФА в реакции с ДА *Y. pseudotuberculosis*. Титры специфических антител полученных сывороток представлены в таблице 1.

Как видно из таблицы 1, в контрольных группах рост титра антител прямо пропорционально связан с увеличением дозы ДА и количеством проведённых иммунизаций.

В опытных группах оба адьюванта стимулируют выработку антител. Их использование позволяет получать после 5 иммунизации сыворотки с высоким титром антител (1:409600-1:819200). Однако активность ПАФ несколько выше, чем ПААГ.

Следует отметить, что применение ПАФ приводит к образованию в подкожной клетчатке кроликов множества болезненных уплотнений, которые не успевают рассасываться между иммунизациями. Гистологические исследования данных уплотнений показало наличие в них незрелых лимфобластных и делящихся клеток, окружённых соединительнотканной капсулой с мелкими участками кровоизлияний.

Таблица 2

Кличество лейкоцитов в крови кроликов, иммунизированных ДА *Y. pseudotuberculosis* с использованием ПААГ и ПАФ

Дозы ДА, мг/кролика	Наличие адъюванта (опыт)								
	ПААГ			ПАФ			ФР (контроль)		
	Количество лейкоцитов в крови кролика (10^9 клеток/литр)								
	WBC	L	G	WBC	L	G	WBC	L	G
0,2	5,0	2,5	1,5	13,4	4,1	8,3	3,2	2,1	0,7
1	6,3	3,3	2,4	13,9	4,6	9,0	4,6	2,6	1,6
2	7,8	3,2	3,5	14,6	4,9	9,1	5,0	2,9	2,0
4	11,5	4,8	5,6	16,4	5,6	10,1	8,2	3,6	4,1
8	15,5	5,8	8,7	17,7	6,5	10,6	11,8	4,1	6,5
16	15,9	6,1	8,6	18,7	7,4	11,1	15,7	5,1	8,8

Для оценки влияния адъювантов на клеточный иммунитет после 5-й иммунизации нами было проведено определение общего количества лейкоцитов (WBC), в т.ч. лимфоцитов (L) и гранулоцитов (G) (табл. 2).

В контрольной группе без адъюванта с ростом дозы антигена увеличивается воспалительная реакция, о чём свидетельствует динамика нейтрофильного лейкоцитоза. В очаге воспаления создаётся «депо антигена», привлекающее макрофагов, способствующее дифференцировке Т- и В-лимфоцитов, и как следствие, синтезу антител.

В опытной группе с ПААГ процессы протекают сходным образом, однако в месте иммунизации добавляется слабое раздражающее действие адъюванта.

В опыте с ПАФ наблюдается сильный нейтрофильным лейкоцитоз, связанный со значительным раздражающим эффектом от адъюванта. Рост количества лимфоцитов с увеличением дозы антигена значительнее, чем при использовании ПААГ, что согласуется с более высокими титрами антител.

Обсуждение

Высокие дозы ДА (16,0 мг/кролика) компенсируют отсутствие адъюванта и позволяют получать сыворотки с высоким титром антител без участия адъюванта, поэтому использование адъювантов целесообразно только при низких и средних дозах ДА (0,2-8,0 мг/кролика). В опытных группах наиболее ярко стимулирующий эффект адъювантов выражен при малых дозах ДА (0,2-1 мг/кролика).

Значительный рост титра антител при дозах 0,2-2 мг/кролика (табл. 1) на фоне небольшого увеличения числа лимфоцитов (табл. 2) свидетельствует о том, что стимулирующее дей-

ствие ПААГ и ПАФ на антителогинез связано со скоростью и качеством дифференцировки лимфоцитов и в меньшей степени с увеличением их числа.

Несмотря на более высокую антителогенную активность, негативное влияние ПАФ на ткани в месте инъекции не позволяет использовать его для гипериммунизаций.

Заключение

Проведённые исследования позволяют сделать следующие выводы:

1. Использование обоих адъювантов в комплексе с ДА *Y. pseudotuberculosis* позволяет получать гипериммунные сыворотки с высоким титром антител (1:409600-1:819200). Однако активность ПАФ несколько выше, чем ПААГ.

2. Наиболее ярко стимулирующий эффект адъювантов выражен при малых дозах ДА (0,2-1 мг/кролика).

3. Стимулирующее действие комплексов ДА-ПААГ и ДА-ПАФ на антителогинез связано со скоростью и качеством дифференцировки лимфоцитов и в меньшей степени с увеличением их числа.

4. ПААГ обладает слабо раздражающим действием на ткани организма, а ПАФ – сильно раздражающим действием. Применение ПАФ приводит к образованию в подкожной клетчатке кроликов множества болезненных уплотнений, которые не успевают рассасываться между иммунизациями.

5. ПААГ может составить альтернативу ПАФ при гипериммунизации животных ДА *Y. pseudotuberculosis*.

Библиографический список

1. Adjuvants: classification, modus operandi, and licensing / J. S. Apostólico, V. A. S. Lunardelli, F. C. Coirada, S. B. Boscardin, D. S. Rosa // J. Immunol. Res. – Vol. 2016. – Article № 1459394. – URL: <https://dx.doi.org/10.1155/2016/1459394> (дата обращения: 7.09.2022).
2. Garcon, N. From discovery to licensure, the adjuvant system story / N. Garcon, A. D. Pasquale // Hum. Vaccin. Immunother. – 2017. – Vol. 13. – № 1. – P. 19-33. – URL: <https://dx.doi.org/10.1080/21645515.2016.1225635> (дата обращения: 7.09.2022).
3. Giudicea, G. D. Correlates of adjuvant activity: a review on adjuvants in licensed vaccines / G. D. Giudicea, R. Rappuolia, A. M. Didierlaurent // Semin. Immunol. – 2018. – Vol. 39. – P. 14-21. – URL: <https://doi.org/10.1016/j.smim.2018.05.001> (дата обращения: 7.09.2022).
4. Boraschi, D. From antigen delivery system

to adjuvanticy: the board application of nanoparticles in vaccinology / D. Boraschi, P. Italiani // *Vaccines* (Basel). – 2015. – Vol. 3. – № 4. – P. 930-939. – URL: <https://doi.org/10.3390/vaccines3040930> (дата обращения: 7.09.2022).

5. Адьюванты в современной вакцинологии / Е. Ю. Исаенко, Е. М. Бабиц, И. В. Елисеева, Л. А. Ждамарова, В. И. Белозерский, С. А. Колпак // *Annals of Mechnikov Institute*. – 2013. – № 4. – С. 5-21.

5. Петров, Р. В. Иммуногены и вакцины нового поколения / Р. В. Петров, Р. М. Хаитов. – М.: «ГЭОТАР-Медиа», 2011. – 608 с. – ISBN 978-5-9704-1868-0.

7. Оценка антимикробной активности полиазолидинаммония, модифицированного гидрат-ионами йода, в зависимости от его физико-химических характеристик / М. М. Вакараева, В. Ю. Ульянов, О. В. Нечаева, И. О. Лулева, Е. И. Тихомирова, О. Г. Шаповал, Д. А. Заярский // *Саратовский научно-медицинский журнал*. – 2015.

– Вып. 11. – № 3. – С. 255-257.

8. Комплексная оценка токсичности полимерного соединения, обладающего антимикробной активностью / О. В. Нечаева, Н. В. Веденева, М. М. Вакараева, Е. И. Тихомирова, Н. Ф. Шуршалова, Д. А. Заярский, Н. В. Беспалова // *Известия Саратовского университета. Новая серия. Серия: Науки о Земле*. – 2016. – Т. 16. – Вып. 2. – С. 160-164.

9. Manieson, V. E. The use of polyazolidineammonium and dimethyl-sulfoxide antigen *Yersinia pseudotuberculosis* to obtain hyperimmune serum / V. E. Manieson, S. V. Ivaschenko // *E3S Web of Conf.* – 2020. – Vol. 175. – Article № 03011. – URL: <https://doi.org/10.1051/e3sconf/202017503011> (дата обращения: 7.09.2022).

10. Hornbeck, P. V. Enzyme-linked immunosorbent assays / P. V. Hornbeck // *Curr. Protoc. Immunol.* – 2015. – Vol. 110. – P. 2.1.1-2.1.23. – URL: <https://doi.org/10.1002/0471142735.im0201s110> (дата обращения: 7.09.2022).

EFFICIENCY OF OILY AND POLYELECTROLYTE ADJUVANTS IN CASE OF RABBIT HYPERIMMUNIZATION WITH DIMETHYLSULFOXIDE ANTIGEN OF PSEUDOTUBERCULOSIS MICROORGANISM

Manieson V. E., Ivashchenko S. V., Khaptsev Z. Yu.

*Saratov State University of Genetics, Biotechnology and Engineering named after N.I. Vavilov
410600, Saratov, Theater Square, building 1; tel.: 89085533057; e-mail: ivashenko-sv@mail.ru.*

Key words: *Yersinia pseudotuberculosis, complete Freud's adjuvant, polyazolidinammonium, dimethyl sulfoxide antigen, hyperimmune serum*

A comparative evaluation of two adjuvants: polyazolidinammonium modified with iodine hydrate ions (PAAH) and complete Freud's adjuvant (CFA) was conducted. The assessment was carried out in the process of hyperimmunization of rabbits with a mixture of an adjuvant and dimethyl sulfoxide antigen (DA) of a pseudotuberculous microbe. Both adjuvants stimulated antibody genesis and allowed to obtain hyperimmune sera with high antibody titers. However, CFA showed a slightly higher activity (1:819200) than PAAH (1:409600). The most pronounced stimulating effect of adjuvants was expressed at low doses of DA (0.2-1 mg/rabbit). Large doses of the antigen (16.0 mg/rabbit) enabled to obtain sera with a high antibody titer without adjuvants. The stimulating effect of DA-PAAH and DA-CFA complexes on antibody genesis is associated with the rate and quality of lymphocyte differentiation, and to a lesser extent with an increase of their number. PAAH showed a weak irritating effect on body tissues at the injection spot, and CFA had a strong irritating effect. The application of CFA led to formation of many painful indurations in the subcutaneous tissue of rabbits, which did not resolve between immunizations. Thus, usage of PAAH as an adjuvant in hyperimmunization of rabbits with DA of the pseudotuberculous microbe is potentially productive and without CFA disadvantages.

Bibliography:

1. Adjuvants: classification, modus operandi, and licensing / J. S. Apostólic, V. A. S. Lunardelli, F. C. Coirada, S. B. Boscardin, D. S. Rosa // *J. Immunol. Res.* – Vol. 2016. – Article № 1459394. – URL: <https://dx.doi.org/10.1155/2016/1459394> (Access date: 7.09.2022).
2. Garçon, N. From discovery to license, the adjuvant system story / N. Garçon, A. D. Pasquale // *Hum. Vaccin. Immunother.* – 2017. – Vol. 13. – № 1. – P. 19-33. – URL: <https://dx.doi.org/10.1080/21645515.2016.1225635> (Access date: 7.09.2022).
3. Giudicea, G. D. Correlates of adjuvanticy: a review on adjuvants in licensed vaccines / G. D. Giudicea, R. Rappuola, A. M. Didierlaurent // *Semin. Immunol.* – 2018. – Vol. 39. – P. 14-21. – URL: <https://doi.org/10.1016/j.smim.2018.05.001> (Access date: 7.09.2022).
4. Boraschi, D. From antigen delivery system to adjuvanticy: the board application of nanoparticles in vaccinology / D. Boraschi, P. Italiani // *Vaccines* (Basel). – 2015. – Vol. 3. – № 4. – P. 930-939. – URL: <https://doi.org/10.3390/vaccines3040930> (Access date: 7.09.2022).
5. Adjuvants in modern vaccinology / E. Yu. Isaenko, E. M. Babich, I.V. Eliseeva, L. A. Zhdamarova, V. I. Belozerskiy, S. A. Kolpak // *Annals of Mechnikov Institute*. – 2013. – № 4. – P. 5-21.
6. Petrov, R. V. Immunogens and vaccines of a new generation / R. V. Petrov, R. M. Khaïtov. – М.: "ГЭОТАР-Медиа", 2011. – 608 p. – ISBN 978-5-9704-1868-0.
7. Evaluation of the antimicrobial activity of polyazolidinammonium modified with iodine hydrate ions, depending on its physicochemical characteristics / M. M. Vakaraeva, V. Yu. Ulyanov, O. V. Nechaeva, I. O. Luneva, E. I. Tikhomirova, O. G. Shapoval, D. A. Zayarsky // *Saratov Journal of Medical Scientific Research*. – 2015. – Issue. 11. – № 3. – P. 255-257.
8. Complex toxicity assessment of polymer compound with antimicrobial activity / O. V. Nechaeva, N. V. Vedeneva, M. M. Vakaraeva, E. I. Tikhomirova, N. F. Shurshalova, D. A. Zayarsky, N. V. Bespalova // *Izvestiya of Saratov University. New series. Series: Earth Sciences*. – 2016. – V. 16. – Issue. 2. – P. 160-164.
9. Manieson, V. E. The use of polyazolidineammonium and dimethyl-sulfoxide antigen *Yersinia pseudotuberculosis* to obtain hyperimmune serum / V. E. Manieson, S. V. Ivaschenko // *E3S Web of Conf.* – 2020. – Vol. 175. – Article № 03011. – URL: <https://doi.org/10.1051/e3sconf/202017503011> (Access date: 7.09.2022).
10. Hornbeck, P. V. Enzyme-linked immunosorbent assays / P. V. Hornbeck // *Curr. Protocol. Immunol.* – 2015. – Vol. 110. – P. 2.1.1-2.1.23. – URL: <https://doi.org/10.1002/0471142735.im0201s110> (Access date: 7.09.2022).