

УДК 615.371:619

ИММУННО-БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ МИКРОКАПСУЛИРОВАННОЙ ДНК

С. Ю. Белов**S.Yu. Belov**

*ГНУ Всероссийский научно-исследовательский институт
ветеринарной вирусологии и микробиологии Россельхозакадемии
(Владимирская область, Покров, Россия)*

*State Research Institution the National Research Institute for Veterinary
Virology and Microbiology of Russia (SRI NRIVaMR) of the Russian
Agricultural Science Academy, Pokrov, Vladimir region, Russia.*

Работа относится к области нанотехнологий и технологиям соматической генной терапии. Представлены результаты получения микрокапсул и иммобилизации в них ДНК вируса болезни Ауески и плазмидной ДНК. Микрокапсулирование ДНК может быть использовано как способ доставки ДНК-вакцин.

The work covers nanotechnology and some technologies for somatic gene therapy. Some results for production of microcapsules for Aujeszky's disease virus DNA and plasmid's DNA and immobilization within them are represented. DNA microcapsulation may be used as a DNA-vaccine delivery means.

Введение.

Одним из наиболее важных направлений прикладных исследований на сегодняшний день в медицине является поиск эффективного и безопасного метода доставки лекарственных препаратов и генно-инженерных конструкций в определенные зоны организма. Некоторые из разработанных методов являются эффективными, но не всегда безопасными, другие - вполне безопасны, но часто оказываются малоэффективными при доставке. Представляемая нами технология доставки генетического материала с использованием нетоксичных наночастиц и биополимеров представляется свободной от указанных недостатков. Несомненным преимуществом предлагаемого метода капсулирования и доставки является то, что не требует большого количества наработки генетического материала, поскольку это трудоемкий и дорогостоящий процесс.

Целью нашей работы являлась разработка получения микрокапсул с регулируемыми параметрами (диаметр, толщина оболочки, состав и проницаемость мембраны), способа инкапсулирования нуклеиновых кислот, а также исследования в культуре клеток и на животных адресной доставки генетического материала.

Материалы и методы.

В работе использовали ДНК вируса болезни Ауески (ВБА) штамм МК-25 и плазмиду рTKShi, имеющую в своем составе участок генома, кодирующий полипептид E₂ вируса классической чумы свиней (КЧС), любезно предоставлена д.б.н. Н.Н. Власовой (ГНУ ВНИИВВиМ).

Для проведения инкапсулирования ранее [1,2] были отобраны 3 пары полимеров: поли-L-лизин / альгинат, ДЕАЕ- декстран / каррагинан и сульфат

хитозана / каррагинан, являющиеся биodeградируемыми и биосовместимыми полимерами и при формировании мультислойной оболочки образующими механически прочную мембрану.

Синтез частиц CaCO_3 проводили по методу Д.В. Володькина [2,4] ДНК включалась в микрочастицы одновременно с образованием частиц CaCO_3 методом соосаждения, усовершенствованному О.Е. Селиной и др. [5,6].

Получение мультислойных полиэлектролитных микрокапсул проводили методом послойной адсорбции противоположно заряженных полиэлектролитов на сферические макropористые карбонатнокальциевые микрочастицы.

Процесс формирования микрокапсул, содержащих иммобилизованную ДНК, включал три основные стадии, которые представлены на рисунке 1:

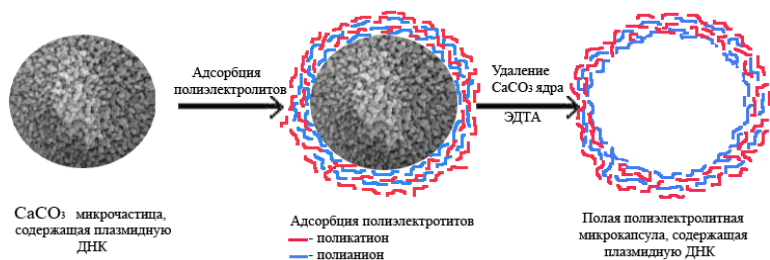


Рис.1. Схематическое изображение формирования многослойной мембраны путем последовательной адсорбции ПЭ.

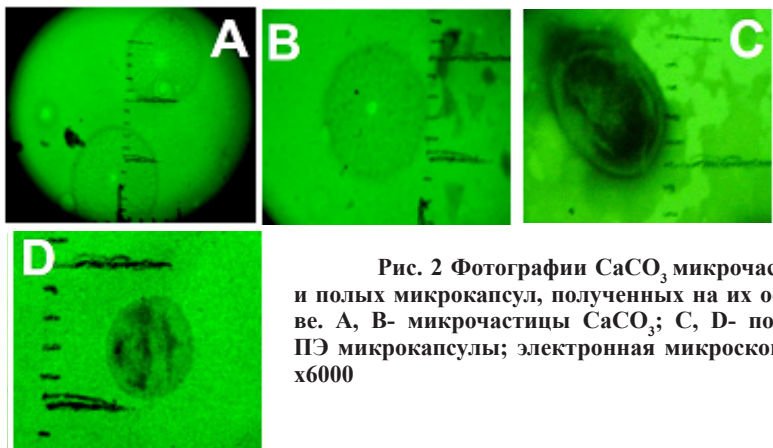


Рис. 2 Фотографии CaCO_3 микрочастиц и полых микрокапсул, полученных на их основе. А, В- микрочастицы CaCO_3 ; С, D- полые ПЭ микрокапсулы; электронная микроскопия, $\times 6000$

Результаты.

Электронно-микроскопические исследования микрокапсул с заключенной в них ДНК показали, что размер микрокапсул составляет 1-2 мкм, а толщина оболочки 0,2 мкм.

Для оценки эффективности переноса ДНК в эукариотические клетки была выбрана ДНК вируса болезни Ауески (ВБА), т.к. ее введение в чувстви-

тельную систему приводит к продуктивной вирусной инфекции, которую можно наблюдать как *in vivo*, так и *in vitro*. Работу проводили в двух направлениях: на животных и в культуре клеток.

Выделение и очистку ДНК осуществляли фенольно-детергентным методом. Для выделения ДНК ВБА вирус концентрировали с помощью преципитации с ПЭГ-6000 в 100 раз. При изучении сорбции ДНК в порах CaCO_3 , установлено, что максимальная сорбция ДНК ВБА из водного раствора составляла 85-90% от начальной концентрации.

С целью формирования стенки микрокапсул на микрочастицы CaCO_3 , содержащие ДНК ВБА поочередно наносили полимеры поли-L-лизина и альгината с последующим растворением карбонатного матрикса.

Оценку биологической активности микрокапсулированной ДНК проводили на кроликах.

Таблица 1. Эффект микрокапсулированной ДНК ВБА при введении кроликам

Вид животного	Форма заболевания, пал/выжил	Результат ПЦР (печень, мозг, селезенка)	Наличие ЦПД при инфицировании суспензией органов
кролики	острая, гибель на 4-5 сутки, 2/0	+	+
	вялотекущая легочная форма, гибель на 21 сутки, 2/0	+	+
кролики, контроль	клинические признаки не выявлялись	-	нет

Контрольным животным инокулировали нативную ДНК в водном растворе. Кролики (50% животных), которым вводили ДНК в микрокапсулах в количестве 6 мкг, пали на 4 и 5 сутки, а у остальных на 6-7 сутки развилась легочная форма болезни. Контрольные животные оставались клинически здоровыми. 10% суспензию печени и мозга павших и забитых животных исследовали методом ПЦР со специфическими праймерами к *gp 50 ВБА*.

ДНК вируса болезни Ауески была выявлена в печени и мозге, инфицированном суспензией органов животных, которым вводили ДНК в микрокапсулах. В контрольной группе ДНК ВБА в суспензии органов не выявляли. Аналогичные результаты были получены при инокуляции суспензии органов от павших кроликов в культуру клеток.

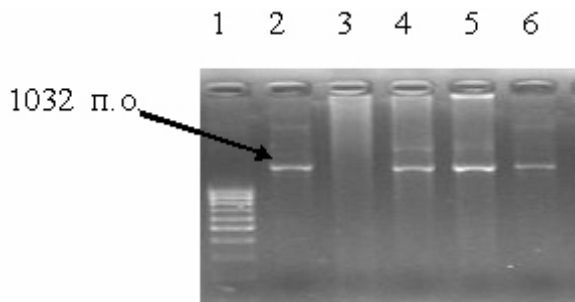


Рис. 2. Результаты ПЦР-анализа для выявления ДНК ВБА:

Треки:

1- маркер 100 п.о.;

4- проба 10%-ой суспензии печени (кролик 2);

2- проба 10%-ой суспензии мозга (кролик 2);

5- ДНК ВБА (штамм МК-25);

3- проба 10%-ой суспензии мозга (кролик 1);

6- проба 10 %-ой суспензии печени (кролик 1);

При разработке генно - инженерных вакцин (ДНК-вакцин, или вакцин 3 поколения) плазмидную ДНК (вектор) с встроенным геном протективного белка вводят непосредственно в организм животного. Поэтому исследовали индукцию антител у мышей в ответ на введение плазмидной ДНК в микрокапсулах различной композиции: $(PLL/Alg)_3$, $(CH-2(mod)/Car)_3$, $(DEAE-dextran/Car)_3$. Для трех групп опытных мышей (по 12 мышей в группе) был создан одинаковый режим содержания.

На 14-е сутки в сыворотках крови мышей, иммунизированных микрокапсулами $(CH-2(mod)/Car)_3$, наблюдали наиболее высокий титр антител. На 21-е сутки титры антител сывороток крови при иммунизации микрокапсулами $(DEAE-dextran/Car)_3$ и $(CH-2(mod)/Car)_3$ сравнялись и были в 3-4 раза выше, чем в случае иммунизации микрокапсулами $(PLL/Alg)_3$, (таб. 2)

Таблица 2. Титр антител при иммунизации мышей микрокапсулами разного состава, содержащими плазмиду pTKShi.

Взятие крови, сутки	Титр антител		
	$(PLL/Alg)_3$	$(CH-2(mod)/Car)_3$	$(DEAE-dextran/Car)_3$
14	1:800-1:1600	1:6400-1:25600	1:6400-1:12800
21	1:3200-1:6400	1:12800-1:25600	1:12800-1:25600

Примечание: Титр нормальной сыворотки белой мыши (0) – 1:50

Как видно из данных, представленных в таблице, при введении одинакового количества инкапсулированной плазмидной ДНК, индукция антител зависела от композиционного состава микрокапсул.

Определение титра специфических антител в сыворотках крови мышей,

инокулированных препаратами плазмид проводили методом непрямого твердо-фазного ИФА. Результаты оценивали спектрофотометрическим методом с помощью Multiskan MCC 340 (Labsystems, Finland) при $\lambda = 405$ нм.

Выводы.

Использование описанного выше метода доставки генетического материала с использованием микросфер в ветеринарной медицине позволит не только эффективно доставлять биологически активные молекулы сквозь различные барьеры организма, которые они не способны преодолевать самостоятельно (ферментные системы макроорганизма), но и существенно снижать эффективную дозу вводимого препарата.

Литература:

1. A. Bartkowiak, W. Brylak, , Polimery 51 (7-8), (2006), 547-554
2. Bartkowiak A., Wandrey Ch., Hunkeler D. // Abstract Book of second International Symposium on Polyelectrolytes, Trondheim, Norway 1998, P. 14.
3. Mahato R. I., Takakura Y., Hashida M. (1997). J. Drug Targeting. 4, 337-357
4. Petrov A.I., Volodkin D.V., Sukhorukov G.B. (2005) Biotechnol. Prog., 21, 918-925.
5. В.И. Балышева, Н.Н. Власова, О.Е. Селина, С.Б. Белов, Е.А. Марквичева, Г.Б. Сухоруков, Российский ветеринарный журнал. 2007. №1, стр. 25-26.
6. О.Е. Селина, С. Ю. Белов, Н.Н. Власова, В.И. Балышева и др., Биорганическая химия, Vol 35, № 1, 2009 P. 113-115

РАЗРАБОТКА СИСТЕМЫ ТЕСТОВ ДЛЯ ВЫДЕЛЕНИЯ И ИДЕНТИФИКАЦИИ PSEUDOMONAS PUTIDA

Викторов Д.А., Богданов И.И., Шестаков А.Г., Васильев Д.А.

*Working out of the scheme of allocation and system of tests for identification
Pseudomonas putida.*

Pseudomonas putida – **важный в научном и практическом отношении микроорганизм**, широко населяющий биосферу и принимающий активное участие в её процессах. Штаммы данной бактерии крайне гетерогенны в отношении источников углеродного питания, ассимилируют от 32 до 84 различных субстратов, благодаря чему *Pseudomonas putida* используют для очистки воды и почвы от нефти и нефтепродуктов. *Pseudomonas putida* **является возбудителем псевдомоноза у прудовых рыб**, сопровождающееся массовой гибелью рыбы, а также причиной возникновения язвенных и гнойных ран кожи у морских млекопитающих. В ряде случаев вызывает гнойно-воспалительные процессы у человека и животных, приводя к таким заболеваниям как инфекции нижних дыхательных путей, абсцессы, бактериемию, раневую инфекцию, инфекции мочевыводящих путей. (Vincent JL, 1995) Кроме того, *Pseudomonas putida* **является фитопатогеном**, поражающим различные растения (Беляков, Япис, 1988; Szolnoki, 1991 и др.) Однако, в других случаях, широко населяя ризосферу, играет важную роль