

# АДЬЮВАНТНЫЙ ЭФФЕКТ ТУБУЛЯРНЫХ ИММУНОСТИМУЛИРУЮЩИХ КОМПЛЕКСОВ, МОДИФИЦИРОВАННЫХ ЭХИНОХРОМОМ А, В ОТНОШЕНИИ ПОРОВОГО БЕЛКА ИЗ *YERSINIA PSEUDOTUBERCULOSIS*

Цыбульский А.В.<sup>1</sup>, Попов А.М.<sup>2</sup>, Портнягина О.Ю.<sup>2</sup>,  
Артюков А.А.<sup>2</sup>, Санина Н.М.<sup>1</sup>, Мазейка А.Н.<sup>1</sup>,  
Костецкий Э.Я.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Дальневосточный федеральный университет, г. Владивосток

<sup>2</sup> Тихоокеанский институт биоорганической химии ДВО РАН, г. Владивосток

**Резюме.** Исследованы иммуногенные свойства вакцинных конструкций, построенных на основе липид-сапониновых тубулярных иммуностимулирующих (ТИ) комплексов и индивидуального антигена — мономерной и тримерной форм порина, выделенного из *Yersinia pseudotuberculosis*. Показана возможность усиления иммунного ответа на порин в составе ТИ-комплексов путем добавления в их состав эхинохрома А (ЭХА), выделенного из морского ежа *Scaphechinus mirabilis*. Иммунизация лабораторных мышей такой вакцинной конструкцией приводит к генерации более интенсивного специфического иммунного ответа гуморального типа к мономерной и тримерной формам порина.

**Ключевые слова:** адъюванты, ИСКОМ, ТИ-комплексы, субъединичный антиген, поровый белок, гуморальный иммунный ответ, эхинохром.

*Tsybulsky A.V., Popov A.M., Portnyagina O.Yu., Artyukov A.A., Sanina N.M., Mazeyka A.N., Kostetsky E.Y.*

**ADJUVANT EFFECT OF TUBULAR IMMUNOSTIMULATING COMPLEXES MODIFIED BY ECHINOCHROME A, TOWARDS A PORE PROTEIN FROM *YERSINIA PSEUDOTUBERCULOSIS***

**Abstract.** We investigated immunogenic properties of vaccine constructs based on lipid-saponin tubular immunostimulating complexes (TI-complexes), and an individual antigen, i.e., monomeric and trimeric forms of porin isolated from *Yersinia pseudotuberculosis*. An opportunity of enhanced immune response to TI-embedded porin was shown upon addition of echinochrome A (ECA) from sea urchin *Scaphechinus mirabilis* to TI-complexes. Immunization of mice with such a vaccine preparation results into a more intense specific humoral immune response to monomeric and trimeric forms of porin. (*Med. Immunol.*, 2011, vol. 13, N 2-3, pp 139-144)

**Keywords:** adjuvants, ISKOM, TI complexes, subunit antigen, porin, humoral immune response, echinochrome.

## Адрес для переписки:

Цыбульский Александр Васильевич  
690002, г. Владивосток, ул. Острякова, 46, кв. 1.  
Тел.: (4232) 45-77-79.  
E-mail: avt\_biotech@mail.ru

## Введение

Исследования, направленные на получение вакцин против возбудителей инфекционных заболеваний, характеризуются усиливающимся интересом к получению вакцинных препаратов

на основе индивидуальных субъединичных антигенов инфекционных агентов. Такие вакцины характеризуются отсутствием возможных негативных побочных реакций, характерных для цельновирионных и сплит-вакцин. Индивидуальные антигены белковой природы позволяют более четко прогнозировать развитие специфической иммунной реакции. Разделение индивидуальных антигенов на составляющие их субъединицы делает возможным достигать уменьшения или полной нейтрализации токсичности, гемагглютинирующей и гемолитической активностей, характерных для многих бактерио- или вирус-специфических белков. Однако ценой подобных манипуляций с антигенами часто является существенное снижение их иммуногенной активности. В связи с этим применяются различные иммунологические адъюванты, в смеси с которыми антиген инъецируется в организм. Несмотря на давнюю историю подобных работ, арсенал адъювантов остается скромным и в большинстве случаев ограничивается солями алюминия.

С 80-х годов XX века одними из наиболее перспективных адъювантных систем считаются иммуностимулирующие комплексы ИСКОМ — гексагональные наноразмерные структуры, состоящие из фосфолипидов, холестерина и смеси сапонинов, названной Quilla и полученной из коры мыльного дерева *Quillagja saponaria*. ИСКОМ характеризуются выраженной способностью инкорпорировать белковый антиген в свою матрицу и проявлять иммуноадъювантную активность. Однако широкому применению вакцин на основе ИСКОМ прежде всего мешает отсутствие до настоящего времени полного определения структуры смеси гликозидов Quilla, которые при образовании комплекса с холестерином и в присутствии фосфолипидов формируют характерную округлую форму ИСКОМ [15].

В наших исследованиях мы отказались от применения иммунологически нейтральных фосфолипидов и смеси тритерпеновых гликозидов Quilla, используя в качестве формообразующих единиц моногалактозилдиацилглицерол (МГДГ), выделенный из морской водоросли *Ulva fenestrata*, индивидуальный тритерпеновый гликозид кукумаризид  $A_2-2$  (КД) из дальневосточного вида промысловых голотурий *Cucumaria japonica*, обладающий выраженной иммуноадъювантной активностью, и холестерин [2, 3, 10].

Наноразмерные структуры тубулярной формы образовывались на основе механизмов самосборки липидных молекул и комплексообразования между КД и холестерином. Подобно ИСКОМ, эти суперструктуры, названные нами ТИ-комплексами, характеризовались способностью инкорпорировать белковые анти-

гены и проявлять иммуноадъювантную активность, но при этом имели существенно меньшую токсичность в сравнении с ИСКОМ [2, 14]. В качестве модельного антигена, способного с высокой эффективностью (не менее 95%) встраиваться в ТИ-комплексы мы использовали порообразующий белок (порин), выделенный из *Y. pseudotuberculosis*. Этот интегральный мембранный белок — один из факторов патогенности возбудителя и является его протективным антигеном [4, 7, 8, 9].

В настоящей работе для иммунизации экспериментальных животных мы использовали субъединичную мономерную термостабильную и нативную термолабильную тримерную формы порина, которые применялись как отдельно, так и в составе ИСКОМ и ТИ-комплексов. Исследована возможность повышения иммуноадъювантной активности липид-сапониновой матрицы ТИ-комплексов в отношении порина путем добавления в нее молекул эхинохрома А (ЭХА), обладающих большим спектром биологической активности [13] и способных, как мы предположили, за счет антиоксидантных свойств и особенностей взаимодействия с липидами повысить резистентность ТИ-комплексов к биodeградирующим воздействиям, пролонгируя таким образом антигенную стимуляцию.

## Материалы и методы

Мыши линии СВА (120 голов) содержались в стандартных условиях. Все эксперименты проведены в соответствии с нормативами. Забой животных производили декапитацией под эфирным наркозом.

Порин выделяли из микробной массы *Y. pseudotuberculosis* (штамм 598, I серовар (НИИ-ЭМ СО РАМН, г. Владивосток). Изолированную термоденатурированную форму порина получали диссоциацией комплекса пептидогликан-белок при 100 °С в присутствии 2% SDS [7].

ТИ-комплексы получали методом гидратации липидных пленок, модифицированных нами [5]. ИСКОМ получали в соответствии с методом [15]. Введение порина в ТИ-комплексы и ИСКОМ осуществляли аналогичным способом [5].

ЭХА получен в ТИБОХ ДВО РАН (лаборатории биотехнологии ТИБОХ ДВО РАН, зав. к.х.н. Артюков А.А.). ЭХА добавляли к ТИ-комплексам одновременно с порином. При иммунизации животных использовали дозы порина из расчета 10 мкг/мышь. ЭХА использовали в дозе 4 мкг/мышь.

Для экспериментов с мономером и тримером порина были сформированы одинаковые экспериментальные группы животных (по 10 голов в каждой): 1 — «контроль» (неиммунизированные

мыши), 2 – «порин 10» (иммунизация мышей порином в дозе 10 мкг/мышь), 3 – «порин 10 + ИСКОМ» (иммунизация мышей порином в составе классических ИСКОМ), 4 – «порин 10 + ТИ» (иммунизация мышей порином в составе ТИ-комплексов), 5 – «порин 10 + ТИ + ЭХА» (иммунизация мышей порином в составе ТИ-комплексов с ЭХА). Иммунизацию животных порином и ТИ-комплексами с порином производили однократно подкожно (п/к) в объеме 0,2 мл ФСБ с pH 7.4. Контрольные животные получали только инъекцию раствора ФСБ. Кровь для анализа брали через 14 дней после иммунизации. Содержание специфических антипориновых антител в сыворотках крови животных, разведенных в ФСБ в соотношении 1/80, определяли методом непрямого твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА). Сыворотки неиммунизированных животных служили в качестве контроля. Определение оптической плотности (ОП) проводили с использованием планшетного фотометра Elx808IU "Biotek Instr." (США). Концентрацию антител выражали в единицах оптической плотности (ОП) при длине волны 492 нм.

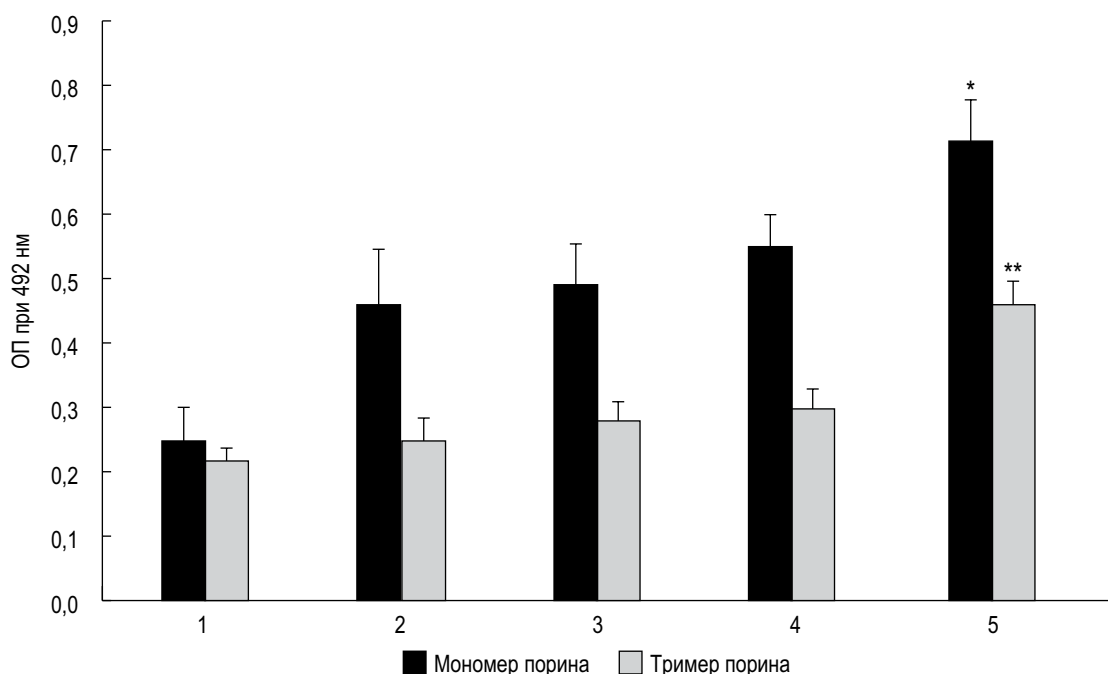
Реакцию гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ) проводили по стандартной методике. На 6-й день после первичной иммунизации порином в дозе 10 мкг/мышь (п/к в меж-

лопаточную область в объеме 0,2 мл ФСБ) всем животным в подушечку одной задней лапки вводили разрешающую дозу порина в половинной дозе от используемой для сенсibilизации в объеме 0,02 мл ФСБ. В контрлатеральную подушечку лапки в том же объеме вводили ФСБ. Местную воспалительную реакцию оценивали через 24 ч путем определения веса опытной и контрольной лапок мышей. Интенсивность местной реакции определяли по индексу воспаления (ИВ) ГЗТ, рассчитываемого как процент прироста массы опытной лапки относительно контрольной.

Статистический анализ проводили с использованием прикладной программы SPSS 11/0 с определением критерия достоверности Фишера–Стьюдента.

## Результаты

При анализе уровня содержания антипориновых антител в сыворотке крови установлено, что при однократной иммунизации в дозе 10 мкг/мышь гуморальный иммунный ответ на тример порина не регистрировался, тогда как мономерная форма порина индуцировала существенный ( $p < 0,05$ ) прирост содержания специфических антипориновых антител (рис. 1).



**Рисунок 1.** Содержание антител против мономерной и тримерной формы порина из *Y. pseudotuberculosis* через 14 дней после однократной п/к иммунизации порином в дозе 10 мкг/мышь

**Примечание.** По оси абсцисс: экспериментальные группы животных.

1 – контроль; 2 – Порин 10; 3 – Порин 10 + ИСКОМ; 4 – Порин 10 + ТИ; 5 – Порин 10 + ТИ + ЭХА.

По оси ординат: ОП при 492 нм.

\* – Достоверное отличие от группы № 2 при  $p < 0,05$ .

\*\* – Достоверное отличие от группы № 2 при  $p < 0,01$ .

Включение как мономера, так и тримера порина в состав липид-сапониновых наноразмерных адъювантных комплексов (классических ИСКОМ и ТИ-комплексов) не приводило к статистически значимым изменениям величины специфического иммунного ответа ( $p > 0,05$ ). Заметное статистически достоверное ( $p < 0,05$ ) усиление иммунного ответа к поровому белку мы обнаружили при использовании в качестве носителя ТИ-комплексов, модифицированных добавлением в липид-сапониновую матрицу молекул ЭХА. Химическая формула этого полигидроксиафтахинона представлена на рисунке 2. Для ЭХА характерен высокий антиоксидантный потенциал: он способен в первую очередь эффективно нейтрализовать пероксильные радикалы и супероксид-анионы [13]. Кроме этого ЭХА усиливает метаболизм глюкозы, снижая ее содержание в крови, а также резко повышает митохондриогенез в клетках. В связи с этим ЭХА способен достаточно быстро обеспечить повышение функциональных ресурсов различных клеток организма, в том числе и иммунокомпетентных клеток, за счет усиления процессов митохондриогенеза и/или защиты митохондриального аппарата клеток от действия метаболитов, связанных с окислительным стрессом [1].

Добавление молекул ЭХА в ТИ-комплексы с порином приводило к достоверному повышению адъювантной активности комплексов в отношении как мономера ( $p < 0,05$ ), так и тримера порина ( $p < 0,01$ ) (рис. 1). Отметим, что сам по себе ЭХА не обладал иммуноадъювантной активностью в отношении этого же антигена, проявляя даже заметную тенденцию к подавлению порин-специфической реакции ГЗТ при п/к введении антигена в смеси с препаратом ЭХА (ИВ ГЗТ  $1,9 \pm 0,4\%$  при  $6,5 \pm 1,3\%$  у мышей, иммунизированных индивидуальным порином,  $p < 0,05$ ). Такой супрессорный эффект ЭХА в отношении эффекторов ГЗТ, видимо, обусловлен характерной для ЭХА антиоксидантной и противовоспалительной активностью, приводящей к подавлению интенсивности воспалительной реакции

в месте инъекции. В итоге это приводит к снижению интенсивности общей реакции организма животных на антиген, поскольку известно, что механизмы генерации иммунного ответа и воспаления взаимосвязаны.

Также известно, что вещества фенольной и хиноидной природы разными механизмами частично блокируют работу транскрипционных факторов, способствуют гармонизации иммунного ответа и снижению побочных эффектов в виде системного воспалительного ответа, который напрямую зависит от транскрипционной активации генов цитокинов, контролируемых NF- $\kappa$ B и другими факторами транскрипции, отвечающими за реакции на стресс (SRTFs) [11, 12].

Различия в действии ЭХА на анти-пориновый иммунный ответ при его применении в смеси с ТИ-комплексами или без них позволяет предполагать, что ЭХА при добавлении к ТИ-комплексам за счет своей гидрофобности встраивается в липидную матрицу и действует как составная часть ТИ-комплексов, а не как самостоятельный участник в динамике развития иммунного ответа к порину. Возможно, что ЭХА повышает стабильность ТИ-комплексов, защищая их от агрессивных проокислительных механизмов внутренней среды организма. Это позволяет увеличить срок жизни ТИ-комплексов с антигеном, изменить процесс либерализации белка из вакцинной конструкции и, возможно, изменять конформацию и иммуногенность антигена. Таким образом, участие молекул ЭХА в составе ТИ-комплексов несет в себе перспективы как усиления общей иммуноадъювантной активности таких модифицированных носителей белковых антигенов, так и снижения риска возникновения побочных реакций при иммунизации.

Отдельный вопрос при анализе полученных в данном эксперименте результатов связан с установлением более высокой иммуногенной активности мономера порина в сравнении с нативным тримером ( $p < 0,01$ ) (рис. 1). Общим правилом, как известно, является наличие более высокой иммуногенности у белков, сохраняющих нативную структуру, в сравнении с их субъединицами. Именно низкая иммуногенность субъединичных антигенов активизировала работы по созданию на их основе различных вакцинных конструкций, имеющих в своем составе иммуноадъювантную матрицу. Полученные нами обратные результаты обусловлены особенностями белка, взятого в качестве антигена. Поровый белок *Y. pseudotuberculosis* является фактором патогенности этого возбудителя и в данной дозе 10 мкг/мышь, очевидно, сохраняет иммуноток-

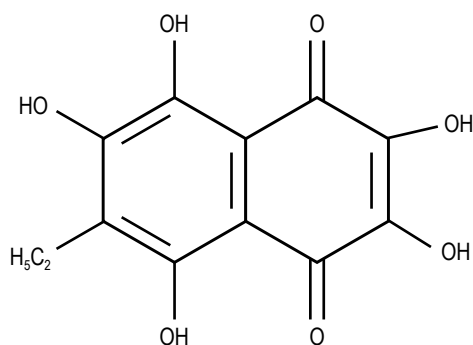


Рисунок 2. Химическая структура эхинохрома А

сическое действие, приводящее к негативной модуляции интенсивности иммунного ответа.

Пример порина, являясь структурно и функционально полноценным белком, оказывается существенно токсичнее, что может проявляться, в том числе, в повреждении мембран иммунокомпетентных клеток по механизму порообразования и, как следствие, приводить к транзиторной иммуносупрессии. Мономерная субъединица в данных концентрациях не проявляет мембранотоксичности, что подтверждено в серии более ранних экспериментов [7, 9]. Момеры порина могут спонтанно организовываться в олигомерные комплексы, в том числе — образовывать и тримеры, способные проявлять специфичные для поринов функции и, в конечном итоге, приводить к повреждению мембран клеток. Очевидно, что использованная нами доза мономера порина не является достаточной для формирования критической концентрации функционально полноценных олигомеров, способных лизировать клетки, в том числе иммунокомпетентные. Результатом является отсутствие явлений мембранотоксичности, которая, видимо, имеет место в случае применения тримерной формы белка и приводит, в конечном итоге, к снижению силы иммунного ответа на этот антиген.

## Обсуждение

Пример порина из *Y. pseudotuberculosis* в дозе 10 мкг/мышь проявляет меньшую иммуногенность в сравнении с мономерной формой порина вследствие, как мы полагаем, сохранения порообразующей функции у тримера и связанной с этим мембранотоксичности этого антигена. Мы полагаем, что повреждение тримером порина мембран иммунокомпетентных клеток может быть объяснением отсутствия гуморального иммунного ответа к этому антигену при использовании однократного введения данной дозы этого белка (при использовании схемы бустер иммунизации и меньших доз мономера и тримера порина регистрируется обратная картина — более высокая иммуногенность именно тримерной формы белка: эти результаты находятся в печати). Использование липид-сапониновых комплексов (ИСКОМ и ТИ-комплексов) в качестве носителей и адъювантов для порина не приводит при однократной иммунизации к усилению гуморального порин-специфического иммунного ответа. В целом, эти данные позволяют говорить о проблематичности использования порового белка как антигена для вакцинных конструкций ввиду его слабой иммуногенности и заметного потенциала к проявлению токсической активности. Только при модификации состава ТИ-комплексов с помощью добавления в них молекул ЭХА происхо-

дит оптимизация свойств получаемой вакцинной конструкции, обеспечивающая усиление иммуногенности порового белка. Вероятно, это происходит вследствие редокс-стабилизирующего влияния молекул ЭХА на липид-сапониновую структуру матрицы комплексов. Следствием этого может быть повышение стабильности таких комплексов и более растянутое во времени высвобождение антигена из них.

Применение ЭХА в составе вакцинных конструкций, таким образом, является перспективным способом усиления их иммуногенности и снижения риска возможных побочных реакции при иммунизации. Требуется специального изучения механизма действия молекул ЭХА на характеристики собственно липид-сапониновой матрицы, а также — на конформацию и иммуногенность белкового антигена в ее составе.

## Благодарности

Работа поддержана грантом Правительства РФ для государственной поддержки научных исследований, проводимых под руководством ведущих ученых в российских образовательных учреждениях, договор 11.G34.31.0010 и грантом Министерства образования и науки РФ (проект АБЦП 2.2.2/603/1013).

## Список литературы

1. Кривошапко О.Н., Попов А.М., Артюков А.А. Здоровье. Медицинская экология. Наука. — 2009. — № 4-5. — С. 85-88.
2. Ли И.А., Попов А.М., Цыбульский А.В., Санина Н.М., Костецкий Э.Я., Новикова О.Д., Портнягина О.Ю., Мазейка А.Н. Иммуностимулирующие свойства липид-гликозидного носителя антигена на основе кукумариозида А2-2 и моногалактозилдиацилглицерола из морских водорослей // Прикладная биохимия и микробиология. — 2008. — № 6. — С. 694-700.
3. Мазейка А.Н., Попов А.М., Калинин В.И., Авилов С.А., Сильченко А.С., Костецкий Э.Я. Комплексообразование тритерпеновых гликозидов голотурий с холестерином как основа липид-сапониновых носителей субъединичных антигенов // Биофизика. — 2008. — № 5. — С. 826-835.
4. Новикова О.Д., Зыкова Т.А., Ядыкина Г.М., Глазунов В.П., Соловьева Т.Ф., Оводов Ю.С. Изучение иерсинина — основного полипептида внешней мембраны *Yersinia pseudotuberculosis* // Биологические мембраны. — 1985. — Т. 2. — С. 714-723.
5. Попов А.М., Санина Н., Костецкий Э.Я., Ли И.А., Цыбульский А.В., Шныров В.Л. Носитель и адъювант для антигенов // Патент РФ. — 2007. — № 2311926.

6. Попов А.М. Механизмы биологической активности гликозидов женьшеня: сравнение с гликозидами голотурий // Вестник ДВО РАН. — 2006. — № 6. — С. 92-104.
7. Портнягина О.Ю., Новикова О.Д., Вострикова О.П., Соловьева Т.Ф. Динамика иммунного ответа к порину из наружной мембраны *Yersinia pseudotuberculosis* // Бюлл. Эксп. Биол. Мед. — 1999. — № 10. — С. 437-440.
8. Супотницкий М.В. Протективные свойства порообразующих белков патогенных бактерий // Вестник РАМН. — 1996. — № 8. — С. 18-22.
9. Тимченко Н.Ф., Новикова О.Д., Павлова Т.Н., Венедиктов В.С., Соловьева Т.Ф. Протективные свойства порина из внешней мембраны *Yersinia pseudotuberculosis* // Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. — 1990. — № 11. — С. 48-50.
10. Цыбульский А.В., Санина Н.М., Ли И.А., Попов А.М., Костецкий Э.Я., Портнягина О.Ю., Шныров В.Л. Разработка нового адъювантного липид-сапонинового комплекса и его применение при экспериментальной иммунизации бактериальным антигеном // Биомедицинская химия. — 2007. — № 3. — С. 297-306.
11. Checker R., Sharma D., Sandur S.K., Khanam S., Poduval T.B. Anti-inflammatory effects of plumbagin are mediated by inhibition of NF-kappaB activation in lymphocytes // Int. Immunopharmacol. — 2009. — Vol. 9. — P. 949-958.
12. Hawiger J.. Innate immunity and inflammation: a transcriptional paradigm // Immunol Res. — 2001. — Vol. 23. — P. 99-109.
13. Lebedev A.V., Ivanova M.V., Levitsky D.O. Iron chelators and free radical scavengers in naturally occurring polyhydroxylated 1,4-naphthoquinones // Hemoglobin. — 2008. — Vol. 32. — P. 165-179.
14. Lee I.A., Popov A.M., Sanina N.M., Kostetsky E.Y., Novikova O.D., Reunov A.V., Nagorskaya V.P., Shnyrov V.L. Morphological and immunological characterization of immunostimulatory complexes based on glycoglycerolipids from *Laminaria japonica* // Acta Biochim. Polon. — 2004. — Vol. 51. — P. 263-272.
15. Lövgren K., Morein B. The requirement of lipids for the formation of immunostimulating complexes (iscoms) // Biotech. Appl. Biochem. — 1988. — Vol. 10. — P. 161-172.

поступила в редакцию 18.03.2011

отправлена на доработку 21.03.2011

принята к печати 25.03.2011