

УСИЛЕНИЕ СПЕЦИФИЧЕСКОГО Т-КЛЕТОЧНОГО ИММУННОГО ОТВЕТА ПРИ ИММОБИЛИЗАЦИИ АНТИГЕНА НА МИКРО- И НАНОЧАСТИЦАХ

Р.Г. Сахабеев¹, Д.С. Поляков¹, А.Д. Гошина², А.А. Вишня³, И.В. Кудрявцев¹,
Е.С. Сеницына^{4,5}, В.А. Коржилов-Влах⁴, Т.Б. Тенникова⁴, М.М. Шавловский^{1,6}

¹ ФГБНУ Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия

² ФГБОУ ВО Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

³ Российский государственный педагогический университет им. А.И. Герцена, Санкт-Петербург, Россия

⁴ Институт химии, ФГБОУ ВО Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

⁵ ФГБНУ Институт высокомолекулярных соединений РАН, Санкт-Петербург, Россия

⁶ ФГБОУ ВО Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. академика И.П. Павлова, Санкт-Петербург, Россия

Резюме. Данная работа является частью проекта по созданию «ловушек» вирусных частиц. Создание подобных «ловушек» осуществляется за счет ковалентной иммобилизации на поверхности нано- или микрочастиц на полимерной основе рекомбинантного рецептора, специфического для данного вируса. Предполагается, что полученные конъюгаты «белок–частица» будут способны к связыванию с вирионами для последующего поглощения их клетками иммунной системы организма. Целью работы являлось изучение влияния микро- и нано-частиц на основе полимолочной кислоты (ПМК), а также блок-сополимера ПМК и полиэтиленгликоля (ПМК-ПЭГ) на клеточный иммунный ответ в отношении антигена, связанного с данными полимерными частицами. **Материалы и методы.** Методом аффинной хроматографии был получен рекомбинантный химерный модельный белок бета-2-микроглобулин — зеленый флуоресцентный белок ($\beta 2M$ -sfGFP). Рекомбинантный белок иммобилизовали на полимерных частицах, которые использовали для иммунизации мышей. В работе использовали самок мышей-гибридов F1 (CBA x C57BL) 4–6-месячного возраста массой в среднем 20–25 г. Опытные и контрольные группы включали по 15 животных. Для оценки клеточного иммунного ответа был использован метод внутриклеточного окрашивания цитокинов. **Результаты и обсуждение.** Показано, что наночастицы на основе сополимера полимолочной кислоты и полиэтиленгликоля способны связывать 10 мкг белка на 1 мг полимера, а микрочастицы на основе полимолочной кислоты — 2,3 мкг белка на 1 мг полимера. Первая группа мышей была иммунизирована конъюгатом частиц на основе сополимера полимолочной кислоты и полиэтиленгликоля диаметром 100 нм с модельным белком. Вторая — смесью этих же частиц с растворимым модельным белком. Третья группа была иммунизирована конъюгатом частиц на основе полимолочной кислоты диаметром 1400 нм с модельным белком. Четвертая — смесью этих же частиц с растворимым модельным белком. Селезенки забирали через 2 недели после четырехкратной внутрибрюшинной иммунизации. Сравнение иммунного ответа в группах было осуществлено при помощи непараметрического критерия Краскела–Уоллиса с поправкой Гьюки. Было показано, что количество антиген-специфических Т-клеток фенотипа CD4⁺ (Т-хелперов), вырабатываемых к модельному белку, значительно выше при иммунизации мышей конъюгатом частиц и $\beta 2M$ -sfGFP, чем

Адрес для переписки:

Сахабеев Родион Григорьевич
197376, Россия, Санкт-Петербург, ул. Академика Павлова, 12,
ФГБНУ Институт экспериментальной медицины.
Тел.: 8 953 152-68-07. E-mail: helm505@mail.ru

Contacts:

Rodion G. Sakhabeev
197376, Russian Federation, St. Petersburg, Academician
Pavlov str., 12, Institute of Experimental Medicine.
Phone: +7 953 152-68-07. E-mail: helm505@mail.ru

Для цитирования:

Сахабеев Р.Г., Поляков Д.С., Гошина А.Д., Вишня А.А., Кудрявцев И.В.,
Сеницына Е.С., Коржилов-Влах В.А., Тенникова Т.Б., Шавловский М.М.
Усиление специфического Т-клеточного иммунного ответа при
иммобилизации антигена на микро- и наночастицах // Инфекция
и иммунитет. 2021. Т. 11, № 4. С. 777–783. doi: 10.15789/2220-7619-
ETS-1374

Citation:

Sakhabeev R.G., Polyakov D.S., Goshina A.D., Vishnya A.A., Kudryavtsev I.V.,
Sinityna E.S., Korzhikov-Vlakh V.A., Tennikova T.B., Shavlovsky M.M.
Enhancing the specific T cell immune response against micro- and
nanoparticle immobilized antigen // Russian Journal of Infection and
Immunity = Infektsiya i immunitet, 2021, vol. 11, no. 4, pp. 777–783.
doi: 10.15789/2220-7619-ETS-1374

Исследование выполнено при финансовой поддержке гранта РФФ № 19-73-10045.

The study was funded by Russian Science Foundation Grant No. 19-73-10045.

при иммунизации смесью белка и немодифицированных частиц, которая проводилась в контрольных группах. Разница оказалась достоверной ($p < 0,001$). При этом было установлено, что количество антиген-специфических $CD8^+$ Т-клеток к модельному белку $\beta 2M$ -sfGFP во всех исследуемых группах не различалось.

Ключевые слова: микрочастицы из гомополимера полимолочной кислоты, наночастицы из сополимера полимолочной кислоты и полиэтиленгликоля, «ловушки» вирусов, зеленый флуоресцентный белок, клеточный иммунный ответ.

ENHANCING THE SPECIFIC T CELL IMMUNE RESPONSE AGAINST MICRO- AND NANOPARTICLE IMMOBILIZED ANTIGEN

Sakhabeev R.G.^a, Polyakov D.S.^a, Goshina A.D.^b, Vishnya A.A.^c, Kudryavtsev I.V.^a, Sinityna E.S.^{d,e}, Korzhikov-Vlakh V.A.^d, Tennikova T.B.^d, Shavlovsky M.M.^{a,f}

^a Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

^b St. Petersburg State University, St. Petersburg, Russian Federation

^c Herzen State Pedagogical University of Russia, St. Petersburg, Russian Federation

^d Institute of Chemistry, St. Petersburg State University, St. Petersburg, Russian Federation

^e Institute of Macromolecular Compounds of the Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, Russian Federation

^f Pavlov First St. Petersburg State Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

Abstract. The current study was a part of the project on generating viral particle traps occurring due to covalent immobilization on the interface of recombinant virus-specific polymer-based nano- and microparticles. It is assumed that protein-particle conjugates could be able to bind virions followed by engulfment by immune cells. The study was aimed to examine the effect of polylactic acid (PLA) and PLA block-copolymer with polyethylene glycol (PLA-PEG)-based micro- and nanoparticles on the cellular immune response against polymeric particle-bound antigen. *Materials and methods.* A recombinant chimeric protein beta-2-microglobulin — green fluorescent protein ($\beta 2M$ -sfGFP) was obtained by affine chromatography. The recombinant protein was immobilized onto the polymer particles, which were further used for mice immunization. Female F1 hybrid mice (CBA x C57BL) in experimental and control groups consisted of 4–6-month-old 15 animals (weighted 20–25 g). Intracellular cytokine staining was used to evaluate the cellular immune response. *Results and discussion.* It was shown that the nanoparticles of PLA block-copolymer with polyethylene glycol (PLA-PEG) were able to bind 10 microgram protein per 1 mg polymer. The polylactic acid nanoparticles were able to bind 2,3 microgram protein per 1 mg polymer. In experiment, mice in group 1 were immunized with 100 nm PLA-PEG particle- $\beta 2M$ -sfGFP conjugate, in group 2 — with same particles together with soluble $\beta 2M$ -sfGFP. In group 3, mice were immunized with 1400 nm PLA particles- $\beta 2M$ -sfGFP conjugate, and in group 4 — with same particles together with soluble protein. The spleens isolated 2 weeks after the four-time intraperitoneal immunization. Comparison of immune response between groups was assessed by nonparametric Kruskal–Wallis criterion with Tukey correction. It was shown that the number of antigen-specific $CD4^+$ T cells produced to model protein was significantly higher after immunization with particle- $\beta 2M$ -sfGFP conjugate, as compared to control groups, wherein immunization was performed with a mixture of protein and unmodified particles ($p < 0.001$). It was found that the number of antigen-specific $CD8^+$ T cells formed against $\beta 2m$ -sfGFP did not differ between all groups examined.

Key words: PLA-based microparticles, PLA-PEG-based nanoparticles, virus “traps”, green fluorescent protein, T-cell immune response.

Введение

Подавление гиперпродукции вирусных частиц в инфицированном организме является одним из направлений противовирусной терапии [8]. Известно, что многие вирусы внедряются в клетки хозяев посредством рецепторного механизма. Следовательно, блокирование рецепторного пути проникновения вирусных частиц в клетки может служить одним из подходов для уменьшения виремии, а значит, и для предотвращения распространения вируса в организме. Мы предлагали для этих целей синтез частиц из уже используемого в медицине материала — сополимера полимолочной кислоты и полиэтиленгликоля (ПМК-ПЭГ) [1, 3]. Нано- и микрочастицы на основе ПМК или ПМК-ПЭГ находят применение в различных областях медицины и биологии, в частности в генной те-

рапии, для таргетной доставки лекарственных препаратов, в том числе в терапии онкологических заболеваний, при вакцинации [5].

Одним из важнейших преимуществ для клинического применения полимерных частиц при вакцинации является их способность к постепенному высвобождению антигена, что позволяет уменьшить число повторных инъекций [9]. Следует отметить, что частицы из ПМК или ПМК-ПЭГ эффективно фагоцитируются антиген-презентирующими клетками *in vitro* и *in vivo*, поэтому большое количество исследований было посвящено изучению их поглощения дендритными клетками и макрофагами [11]. Было показано, что многие антигены, инкапсулированные или адсорбированные на частицах, вызывают широкий и мощный гуморальный иммунный ответ [4]. Следует отметить, что основной задачей большинства вакцин является

формирование плазматических клеток и долгоживущих антиген-специфических В-клеток памяти, способных продуцировать специфические антитела. В то время как специфические антитела способны нейтрализовать внеклеточные патогены, специфический клеточный иммунный ответ также является важнейшим механизмом для контроля внутриклеточных патогенов после инфекции. Клеточный иммунный ответ может ограничивать распространение инфекционных агентов путем распознавания и уничтожения инфицированных или опухолевых клеток.

В данной работе мы исследовали влияние полимерных микро- и наночастиц на клеточный иммунный ответ в отношении связанных с ними модельных белков. Наиболее иммуногенно перспективный тип частиц предполагается использовать в дальнейшем для создания «вирусных наноловушек», которые будут блокировать различные вирусы, в частности вирус гепатита С. Для этого планируется модифицировать полимерную матрицу частиц белками — хозяйскими рецепторами (или их фрагментами), которые обеспечивают проникновение вирионов в эукариотические клетки. Предполагается, что продукты связывания вируса с полимерными частицами могут обеспечивать эффективный клеточный ответ в результате их поглощения антиген-презентирующими клетками (АПК) с последующим процессингом и представлением эффекторным клеткам иммунной системы.

С целью изучения влияния наночастиц на иммунный ответ в отношении связанных белковых молекул была исследована иммуногенность модельных систем на лабораторных животных. В качестве модельного иммуногенного белка был использован рекомбинантный химерный белок бета-2-микроглобулин — зеленый флуоресцентный белок ($\beta 2M$ -sfGFP), а в качестве полимерного носителя — наночастицы из сополимера полимолочной кислоты и полиэтиленгликоля и микрочастицы из гомополимера полимолочной кислоты. В статье представлены результаты оценки иммунного ответа на внутрибрюшинное введение исходных нано- и микро частиц на основе алифатических сложных полиэфиров и частиц с иммобилизованным модельным белком.

Материалы и методы

Связывание белка $\beta 2M$ -sfGFP с наночастицами на основе ПМК-ПЭГ и микрочастицами на основе ПМК. Синтез, выделение и очистку рекомбинантного модельного слитого белка $\beta 2$ -микроглобулина человека с зеленым флуоресцентным белком осуществляли согласно разработанному нами ранее протоколу [1, 2, 14]. Получение и связывание полимерных частиц

с белком осуществляли по методике, описанной ранее [3].

Животные. В работе использовали самок-гибридов F1 (CBA x C57BL) 4–6-месячного возраста массой в среднем 20–25 г. Мышей содержали в виварии при комнатной температуре и режиме освещения 12/12 часов с предоставлением корма и воды *ad libitum*. Для изучения влияния исследуемого препарата на иммунный ответ препараты мышам вводили внутрибрюшинно. Количество $\beta 2M$ -sfGFP для одной иммунизации во всех опытах составляло 1 мкг на 1 мышью. Препараты вводили в объеме 0,4 мл на животное. Иммунизировали мышей 4 раза с интервалом по 2 недели. Вся работа выполнялась в соответствии с международными рекомендациями (этическим кодексом) по проведению медико-биологических исследований с использованием животных (заключение локального этического комитета, выписка из протокола № 3/19 от 25.04.2019).

Изучение полученных сывороток и обработка данных. Анализ содержания специфических антител к sfGFP в сыворотках иммунизированных мышей осуществляли согласно разработанному нами ранее протоколу иммуноферментного анализа (ИФА) [1]. Лунки 96-луночного планшета (Greiner 655061) активировали глутаровым альдегидом в течение часа. Затем в лунки вносили по 100 мкл раствора sfGFP с концентрацией 5 мкг/мл. Спустя час вносили раствор обезжиренного молока с добавлением 0,5%-ного Tween 20. Далее в лунки планшета вносили сыворотки мышей в объеме 100 мкл/лунка. Через час вносили специфические антитела к иммуноглобулинам мыши, конъюгированные с пероксидазой хрена (Goat Anti-Mouse IgG H&L (HRP) (ab97023), Abcam, Англия). Спустя час вносили проявитель (5 мг ТМБ растворяли в 1 мл ацетонитрила) и измеряли поглощение в лунках планшета при длине волны 450 нм с помощью мультимодального ридера CLARIOstar (BMG Labtech, Германия). Анализ данных проводили в программе RStudio 1.1.453.

Выделение и криоконсервация спленоцитов мыши. Клетки выделяли из селезенок спустя 2 недели после последней, четвертой иммунизации. Выделенные селезенки помещали в пробирки типа эппендорф в 1 мл стерильной питательной среды DMEM (41965-039, Gibco, США) с антибиотиком/антимикотиком (15240-062, Gibco, США). Предварительно разрезали селезенку ножницами на 3 части, гомогенизировали в этом же эппендорфе пестиком. Давали отстояться примерно 5 мин. Переносили клеточную суспензию в пробирку на 15 мл и отмывали 10 мл стерильного PBS в течение 10 мин (200g при 10°C). Надосадочную жидкость удаляли, а осадок ресуспендировали в 3 мл буфера для

лизиса эритроцитов и инкубировали 5 мин [12]. Для остановки лизиса в образцы добавляли по 10 мл PBS, после чего осаждали ядродержащие клетки центрифугированием и отмывали избытком стерильного PBS (10 мин при 200g, 10°C). Полученный осадок клеток ресуспендировали в 1 мл эмбриональной телячьей сыворотки (SH30071.02, HyClone, США), а затем на холоде при постоянном перемешивании добавляли 1 мл двукратной криосреды (эмбриональная телячья сыворотка с 20%-ным ДМСО). Помещали по 1 мл суспензии в 2 криопробирки и оставляли в пенопластовом штативе с крышкой при -70°C . На следующий день переносили пробы в жидкий азот, где они хранились до проведения дальнейших исследований.

Метод внутриклеточного окрашивания цитокинов. Клетки мышинных селезенок были охарактеризованы при помощи антител к CD3, меченных APC (клон 17A2, 100236, BioLegend, США), антител к CD4, меченных PE (клон GK1.5, 100408, BioLegend, США), антител к CD8a, меченных PC7 (клон 53-6.7, 100722, BioLegend, США), антител к IFN γ , меченных FITC (клон XMG1.2, 505806, BioLegend, США). Для выявления специфических к sfGFP T-клеток использовали общепринятый метод внутриклеточного окрашивания цитокинов (IFN γ) [7]. Клетки (10^6 в лунке) культивировали в круглодонных 96-луночных планшетах в 200 мкл полной культуральной среды, приготовленной на основе RPMI-1640 (R8758-100ML, Sigma-Aldrich, США) с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки, водного раствора Хепес (Biolot, 1.2.6.), антибиотиков/антимикотиков (15240-062, Gibco, США), 2-меркаптоэтанола (0482-0.1, Amresco, США), ронколейкина 10^6 Ед/мл (НПК «Биотех», Россия). Инкубацию клеток проводили в CO $_2$ -инкубаторе при 37°C в течение 12 ч с антигеном, за 5 ч до завершения эксперимента добавляли 1x раствор BD GolgiPlug (555028, BD Bioscience, США), блокирующие экскрецию цитокинов из клетки. Для определения спонтанной продукции IFN γ вместо стимулятора к клеткам добавляли соответствующий объем питательной среды RPMI-1640. При анализе эти данные (отрицательный контроль) вычитались из показателей, полученных для антиген-стимулированных клеток. Проточную цитометрию проводили на Beckman Coulter Navios.

Результаты

В ходе работы был успешно выделен и очищен модельный белок $\beta 2\text{M-sfGFP}$. Была проведена активация поверхности частиц (генерирование на поверхности полимерных частиц карбоксильных групп и их активация), связывание белка с поверхностью частиц и очистка полученного конъюгата. В качестве основы для создания по-

лимерных частиц использовали ПМК и сополимер ПМК-ПЭГ. Частицы на основе ПМК имели диаметр 1400 нм, PdI 0,32, и были получены методом одинарной эмульсии. Связывающая способность $\beta 2\text{M-sfGFP}$ к частицам составляла 2,3 мкг белка на 1 мг частиц. Частицы на основе ПМК-ПЭГ имели диаметр 105 нм PdI 0,11, были получены методом наноосаждения. Связывающая способность $\beta 2\text{M-sfGFP}$ к частицам составляла 10 мкг белка на 1 мг частиц.

Для изучения влияния частиц на иммуногенность модельного белка были проиммунизированы 4 равные по численности группы мышей (по 15 мышей в каждой группе, всего 60). Первая группа «ПМК_ПЭГ_100_контроль» была проиммунизирована смесью немодифицированных частиц диаметром 105 нм из сополимера полимолочной кислоты и полиэтиленгликоля и свободного $\beta 2\text{M-sfGFP}$, вторая группа «ПМК_ПЭГ_100» — конъюгатом этих же частиц с $\beta 2\text{M-sfGFP}$, таким образом, что количество вводимых частиц и $\beta 2\text{M-sfGFP}$ было одинаковым. Аналогично третья группа «ПМК_1400_контроль» была проиммунизирована смесью частиц диаметром 1400 нм из полимолочной кислоты и $\beta 2\text{M-sfGFP}$, четвертая группа «ПМК_1400» — конъюгатом частиц такого типа с $\beta 2\text{M-sfGFP}$.

Были проведены 4 последовательных иммунизации мышей с интервалами по 2 недели. Забор крови и селезенок осуществлялся через 13 дней после последней иммунизации.

Относительное содержание специфических к белку sfGFP IFN γ^+ лимфоцитов определяли для следующих субпопуляций клеток: CD4 $^+$ T-клетки (IFN γ^+ CD3 $^+$ CD4 $^+$) и CD8 $^+$ T-клетки (IFN γ^+ CD3 $^+$ CD8 $^+$).

Для оценки клеточного ответа был использован метод проточной цитометрии. При помощи критерия Шапиро—Уилка было установлено, что в каждой группе распределение не было нормальным ($p < 0,001$). Поэтому для попарного сравнения четырех групп использовали непараметрический статистический критерий Краскела—Уоллиса с поправкой Тьюки. Результаты попарного сравнения приведены в таблице.

Было показано, что количество антиген-специфических T-клеток иммунологической памяти фенотипа CD4 $^+$ (Т-хелперов) к модельному белку $\beta 2\text{M-sfGFP}$ значимо ниже в случае иммунизации смесью белка и немодифицированных частиц (контрольные группы, а именно «ПМК_ПЭГ_100_контроль» и «ПМК_1400_контроль»), чем в случае иммунизации конъюгатом частиц и $\beta 2\text{M-sfGFP}$ (группы «ПМК_ПЭГ_100» и «ПМК_1400»). Различия статистически достоверны ($p < 0,001$) (рис. 1). Аналогичным образом было определено количество CD8 $^+$ T-клеток к модельному белку. Контрольные группы достоверно не отличались от опытных (рис. 2). Однако

Таблица. Результаты статистического анализа Т-лимфоцитов

Table. Statistical analysis of T lymphocyte counts

	Сравниваемые группы/Compared groups		Р-уровень значимости P-value
CD4⁺ Т-лимфоциты CD4 ⁺ T lymphocytes	ПМК_ПЭГ_100_контроль/PLA_PEG_100_control	ПМК_ПЭГ_100/PLA_PEG_100	< 0,001
	ПМК_1400/PLA_1400	ПМК_ПЭГ_100/PLA_PEG_100	0,977
	ПМК_1400_контроль/PLA_1400_control	ПМК_ПЭГ_100/PLA_PEG_100	< 0,001
	ПМК_1400/PLA_1400	ПМК_ПЭГ_100_контроль/PLA_PEG_100_control	< 0,001
	ПМК_1400_контроль/PLA_1400_control	ПМК_ПЭГ_100_контроль/PLA_PEG_100_control	0,546
	ПМК_1400_контроль/PLA_1400_control	ПМК_1400/PLA_1400	< 0,001
CD8⁺ Т-лимфоциты CD8 ⁺ T lymphocytes	ПМК_ПЭГ_100_контроль/PLA_PEG_100_control	ПМК_ПЭГ_100/PLA_PEG_100	0,709
	ПМК_1400/PLA_1400	ПМК_ПЭГ_100/PLA_PEG_100	0,444
	ПМК_1400_контроль/PLA_1400_control	ПМК_ПЭГ_100/PLA_PEG_100	0,691
	ПМК_1400/PLA_1400	ПМК_ПЭГ_100_контроль/PLA_PEG_100_control	0,058
	ПМК_1400_контроль/PLA_1400_control	ПМК_ПЭГ_100/PLA_PEG_100	0,999
	ПМК_1400_контроль/PLA_1400_control	ПМК_1400/PLA_1400	0,074

наблюдается тенденция к повышению числа CD8⁺ Т-лимфоцитов в случае иммунизации мышью конъюгатом частиц с модельным белком.

Обсуждение

Для эффективной элиминации некоторых вирусов (вируса герпеса, ВИЧ, вируса папилломы человека, вируса гепатита С) из организма носителя требуется индукция не только гуморального, но и цитотоксического иммунного ответа, который основан на активации антиген-специфических CD4⁺ и CD8⁺ Т-лимфоцитов. Именно поэтому для реализации данной задачи в качестве носителей вакцин и лекарств предлагается использовать полимерные нано-

и микрочастицы. Для эффективной активации иммунного ответа необходимым условием является поглощение антигена макрофагами или дендритными клетками с последующей его презентацией в ассоциации с молекулами главного комплекса гистосовместимости.

В нашей работе было установлено, что при внутрибрюшинном введении конъюгат частиц с модельным белком вызывает более выраженный клеточный иммунный ответ по сравнению со смесью частиц с модельным белком (рис. 1). По-видимому, этот эффект связан с особенностями поглощения и презентации антигенов, сорбированных на микрочастицах. По данным литературы, оптимальный размер частиц, поглощаемых макрофагами, составляет 500–

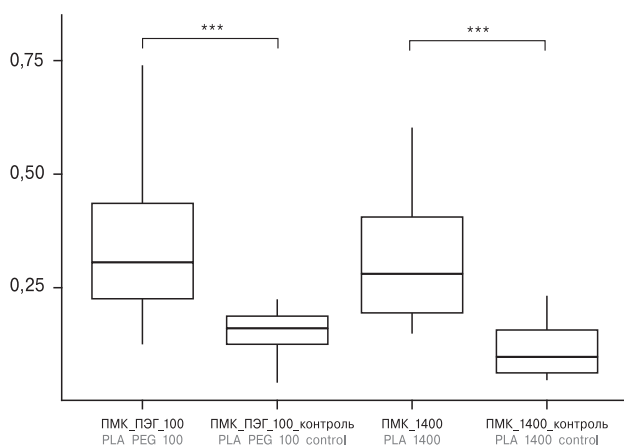


Рисунок 1. Относительное содержание антиген-специфических CD4⁺ Т-клеток к модельному белку β2M-sfGFP у мышей (*) — p < 0,001)**

Figure 1. Relative number of antigen-specific CD4⁺ T cells specific to the model protein sfGFP in mice (***) — p < 0.001)

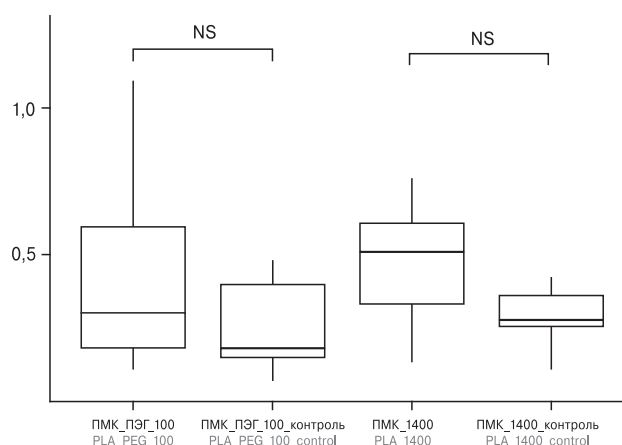


Рисунок 2. Относительное содержание антиген-специфических CD8⁺ Т-клеток к модельному белку β2M-sfGFP у мышей (p > 0,05)

Figure 2. Relative number of antigen-specific CD8⁺ T cells to the model protein sfGFP in mice (NS — non-significant, p > 0.05)

5000 нм [6]. Дендритные клетки эффективно поглощают объекты в диапазоне 20–200 нм. Также было установлено, что частицы с размером до 200 нм проникают в клетки актин-независимым путем (например, клатрин-зависимым эндоцитозом) [15]. Более крупные частицы обычно поглощаются актин-зависимым образом в результате фагоцитоза. Эти особенности поглощения частиц, по-видимому, играют роль в иммунном ответе на антигены, связанные с данными частицами. Эти же особенности отличают иммунный ответ на антигены в составе частиц от ответа на введение обычных классических вакцин [10].

Проведенные нами исследования показали, что содержание CD4⁺ лимфоцитов, продуцирующих IFN γ , после внутрибрюшинного введения модифицированных белками частиц значительно выше, чем после введения несорбированных на частицах белковых антигенов. Размер частиц существенно не влияет на этот показатель. В то же время вне зависимости от состояния антигена (в составе частиц или в свободном состоянии) число CD8⁺ клеток после иммунизации не изменяется.

Следует подчеркнуть, что для эффективной активации CD4⁺ Т-клеток необходим сигнал от молекул главного комплекса гистосовместимости класса II (МНС II), которые экспрессируются на поверхности профессиональных антиген-презентирующих клеток (макрофагов, дендритных клеток и В-лимфоцитов). Таким образом, представленные эксперименты косвенно указывают на то, что частицы с иммобилизованным белком фагоцитируются макрофагами и далее фрагменты антигена представ-

ляются CD4⁺ Т-клеткам. Эти клетки участвуют также в стимуляции продукции цитокинов. CD8⁺ Т-клетки обладают свойствами цитолитических лимфоцитов и распознают антигены в ассоциации с МНС I, которые локализуются почти на всех клетках организма. Таким образом, частицы из полимолочной кислоты способствуют активации Т-хелперного иммунитета, что, совместно с гуморальным ответом, может существенно усиливать иммунный ответ на антигены, в том числе и вирусного происхождения, связанные с частицами.

В ходе предварительных исследований нами было установлено, что модифицированные модельным белком частицы вызывают менее выраженный гуморальный иммунный ответ по сравнению с несорбированным на частицах белком [1]. Более того, в литературе имеется ряд работ, которые доказывают эффективное использование полимерных частиц. Например, исследование, представленное в статье Saini V. и соавт. [13], было направлено на сравнение гуморального и клеточного иммунного ответов между рекомбинантным антигеном вируса гепатита В HBsAg, который был адсорбирован на микрочастицах из ПМК (однократное введение), и квасцовой вакциной с аналогичным антигеном HBsAg (две дозы). Были изучены специфический гуморальный и клеточный иммунные ответы на мышинной модели *in vivo*. На основании полученных авторами результатов был сделан вывод о том, что однократная инъекция полимерных микрочастиц вызвала лучший иммунный ответ (как гуморальный, так и клеточный) при сравнении с двумя инъекциями стандартной квасцовой вакцины против HBsAg.

Список литературы/References

1. Поляков Д.С., Антимонина О.И., Сахабеев Р.Г., Грудинина Н.А., Ходова А.Е., Синицына Е.С., Коржиков-Влах В.А., Тенникова Т.Б., Шавловский М.М. Влияние наночастиц из полимолочной кислоты на иммуногенность связанного с ними белка // *Инфекция и иммунитет*. 2017. Т. 7, № 2. С. 123–129. [Polyakov D.S., Antimonina O.I., Sakhabeev R.G., Grudinina N.A., Khodova A.E., Sinitsyna E.S., Korzhikov-Vlakh V.A., Tennikova T.B., Shavlovsky M.M. Polylactic acid nanoparticles influence on immunogenicity of the protein bound with them. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity*, 2017, vol. 7, no. 2, pp. 123–129. (In Russ.) doi: 10.15789/2220-7619-2017-2-123-129]
2. Поляков Д.С., Грудинина Н.А., Соловьев К.В., Егоров В.В., Сироткин А.К., Алейникова Т.Д., Тотолан Арег А., Шавловский М.М. Бета-2-микроглобулиновый амилоидоз: фибриллогенез природного и рекомбинантных бета-2-микроглобулинов человека // *Медицинский академический журнал*. 2010. Т. 10, № 2. С. 40–49. [Polyakov D.S., Grudinina N.A., Solovyov K.V., Egorov V.V., Sirotkin A.K., Aleinikova T.D., Totolian Areg A., Shavlovsky M.M. Beta2-microglobuline amyloidosis: fibrillogenesis of natural and recombinant human beta2-microglobulines. *Meditsinskii akademicheskii zhurnal = Medical Academic Journal*, 2010, vol. 10, no. 2, pp. 40–49. (In Russ.)]
3. Сахабеев Р.Г., Поляков Д.С., Грудинина Н.А., Вишня А.А., Козловская А.А., Синицына Е.С., Коржиков-Влах В.А., Тенникова Т.Б., Шавловский М.М. Гуморальный иммунный ответ на антиген, иммобилизованный на наночастицах из сополимера полимолочной кислоты и полиэтиленгликоля // *Молекулярная медицина*. 2019. Т. 17, № 3. С. 32–36. [Sakhabeev R.G., Polyakov D.S., Grudinina N.A., Vishnja A.A., Kozlovskaja A.A., Sinitsyna E.S., Korzhikov-Vlakh V.A., Tennikova T.B., Shavlovsky M.M. The humoral immune response to the antigen immobilized on nanoparticles of copolymer of polylactic acid and polyethylene glycol. *Molekulyarnaya meditsina = Molecular Medicine*, 2019, vol. 17, no. 3, pp. 32–36. (In Russ.) doi: 10.29296/24999490-2019-03-06]
4. Ataman-Önal Y., Munier S., Ganée A., Terrat C., Durand P.Y., Battail N., Verrier B. Surfactant-free anionic PLA nanoparticles coated with HIV-1 p24 protein induced enhanced cellular and humoral immune responses in various animal models. *J. Control. Release*, 2006, vol. 112, no. 2, pp. 175–185. doi: 10.1016/j.jconrel.2006.02.006

5. Ferrari M. Cancer nanotechnology: Opportunities and challenges. *Nat. Rev. Cancer*, 2005, vol. 5, no. 3, pp. 161–171. doi: 10.1038/nrc1566
6. Gamvrellis A., Leong D., Hanley J.C., Xiang S.D., Mottram P., Plebanski M. Vaccines that facilitate antigen entry into dendritic cells. *Immunol. Cell Biol.*, 2004, vol. 82, no. 5, pp. 506–516. doi: 10.1111/j.0818-9641.2004.01271.x
7. He X.-S., Holmes T.H., Zhang C., Mahmood K., Kemble G.W., Lewis D.B., Arvin A.M. Cellular immune responses in children and adults receiving inactivated or live attenuated influenza vaccines. *J. Virol.*, 2006, vol. 80, no. 23, pp. 11756–11766. doi: 10.1128/jvi.01460-06
8. Martin-Subero M., Diez-Quevedo C. Mental disorders in HIV/HCV coinfecting patients under antiviral treatment for hepatitis C. *Psychiatry Res.*, 2016, vol. 246, pp. 173–181. doi: 10.1016/j.psychres.2016.09.041
9. Panyam J., Labhasetwar V. Biodegradable nanoparticles for drug and gene delivery to cells and tissue. *Adv. Drug Del. Rev.*, 2003, vol. 55, no. 3, pp. 329–347. doi: 10.1016/S0169-409X(02)00228-4
10. Park Y.-M., Lee S.J., Kim Y.S., Lee M.H., Cha G.S., Jung I.D., Han H.D. Nanoparticle-based vaccine delivery for cancer immunotherapy. *Immune Network*, 2013, vol. 13, no. 5: 177. doi: 10.4110/in.2013.13.5.177
11. Peres C., Matos A.I., Connot J., Sainz V., Zupančič E., Silva J.M., Florindo H.F. Poly(lactic acid)-based particulate systems are promising tools for immune modulation. *Acta Biomaterialia*, 2017, vol. 48, pp. 41–57. doi: 10.1016/j.actbio.2016.11.012
12. Petukhova G., Naikhin A., Chirkova T., Donina S., Korenkov D., Rudenko L. Comparative studies of local antibody and cellular immune responses to influenza infection and vaccination with live attenuated reassortant influenza vaccine (LAIV) utilizing a mouse nasal-associated lymphoid tissue (NALT) separation method. *Vaccine*, 2009, vol. 27, no. 19, pp. 2580–2587. doi: 10.1016/j.vaccine.2009.02.035
13. Saini V., Jain V., Sudheesh M.S., Dixit S., Gaur R.L., Sahoo M.K., Kohli D. Humoral and cell-mediated immune-responses after administration of a single-shot recombinant hepatitis B surface antigen vaccine formulated with cationic poly(l-lactide) microspheres. *J. Drug Target.*, 2010, vol. 18, no. 3, pp. 212–222. doi: 10.3109/10611860903386920
14. Solovyov K.V., Polyakov D.S., Grudinina N.A., Egorov V.V., Morozova I.V., Aleynikova T.D., Shavlovsky M.M. Expression in *E. coli* and purification of the fibrillogenic fusion proteins ttr-sfgfp and β 2M-sfGFP. *Prep. Biochem. Biotechnol.*, 2011, vol. 41, no. 4, pp. 337–349. doi: 10.1080/10826068.2010.548433
15. Wang Z., Tirupathi C., Minshall R.D., Malik A.B. Size and dynamics of caveolae studied using nanoparticles in living endothelial cells. *ACS Nano*, 2009, vol. 3, no. 12, pp. 4110–4116. doi: 10.1021/nn9012274

Авторы:

Сахабеев Р.Г., младший научный сотрудник отдела молекулярной генетики ФГБНУ Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия;

Поляков Д.С., к.м.н., научный сотрудник отдела молекулярной генетики ФГБНУ Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия;

Гошина А.Д., студентка 4-го курса ФГБОУ ВО Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия;

Вишня А.А., студентка 2-го курса магистратуры Российского государственного педагогического университета им. А.И. Герцена, Санкт-Петербург, Россия;

Кудрявцев И.В., к.б.н., зав. лабораторией иммунорегуляции отдела иммунологии ФГБНУ Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия;

Синицына Е.С., к.х.н., старший научный сотрудник межфакультетской лаборатории биомедицинской химии Института химии ФГБОУ ВО Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия; научный сотрудник лаборатории полимерных сорбентов и носителей для биотехнологии ФГБНУ Институт высокомолекулярных соединений РАН, Санкт-Петербург, Россия;

Коржиков-Влах В.А., к.х.н., доцент межфакультетской лаборатории биомедицинской химии Института химии ФГБОУ ВО Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия;

Теникова Т.Б., д.х.н., профессор, главный научный сотрудник и руководитель межфакультетской лаборатории биомедицинской химии Института химии ФГБОУ ВО Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия;

Шавловский М.М., д.м.н., зав. лабораторией молекулярной генетики ФГБНУ Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия; профессор ФГБОУ ВО Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. академика И.П. Павлова, Санкт-Петербург, Россия.

Authors:

Sakhabeev R.G., Junior Researcher, Department of Molecular Genetics, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation;

Polyakov D.S., PhD (Medicine), Researcher, Department of Molecular Genetics, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation;

Goshina A.D., 4th-year Student, St. Petersburg State University, St. Petersburg, Russian Federation;

Vishnya A.A., 2th-year Master Student, Herzen State Pedagogical University of Russia, St. Petersburg, Russian Federation;

Kudryavtsev I.V., PhD (Biology), Head of the Laboratory of Immunoregulation, Department of Immunology, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation;

Sinitsyna E.S., PhD (Chemistry), Senior Researcher, Interdisciplinary Laboratory of Biomedical Chemistry, Institute of Chemistry, St. Petersburg State University, St. Petersburg, Russian Federation; Researcher, Laboratory of Polymer Sorbents and Carriers for Biotechnology, Institute of Macromolecular Compounds of the Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, Russian Federation;

Korzhiikov-Vlakh V.A., PhD (Chemistry), Associate Professor, Interdisciplinary Laboratory of Biomedical Chemistry, Institute of Chemistry, St. Petersburg State University, St. Petersburg, Russian Federation;

Tennikova T.B., PhD, MD (Chemistry), Professor, Leading Researcher and Head of the Interdisciplinary Laboratory of Biomedical Chemistry, Institute of Chemistry, St. Petersburg State University, St. Petersburg, Russian Federation;

Shavlovsky M.M., PhD, MD (Medicine), Head of the Molecular Genetics Laboratory, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation; Professor, Pavlov First Saint Petersburg State Medical University, St. Petersburg, Russian Federation.

Поступила в редакцию 03.02.2020
Отправлена на доработку 25.03.2020
Принята к печати 14.09.2020

Received 03.02.2020
Revision received 25.03.2020
Accepted 14.09.2020