

# ВЛИЯНИЕ НАНОЧАСТИЦ ИЗ ПОЛИМОЛОЧНОЙ КИСЛОТЫ НА ИММУНОГЕННОСТЬ СВЯЗАННОГО С НИМИ БЕЛКА

Д.С. Поляков<sup>1,2,3</sup>, О.И. Антимонова<sup>1</sup>, Р.Г. Сахабеев<sup>1</sup>, Н.А. Грудинина<sup>1</sup>, А.Е. Ходова<sup>3</sup>, Е.С. Сеницына<sup>3,4</sup>, В.А. Коржиков-Влах<sup>3</sup>, Т.Б. Тенникова<sup>3</sup>, М.М. Шавловский<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>ФГБНУ Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия

<sup>2</sup>Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова, Санкт-Петербург, Россия

<sup>3</sup>ФГБОУ ВО Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

<sup>4</sup>ФГБУН Институт высокомолекулярных соединений РАН, Санкт-Петербург, Россия

**Резюме.** Исследовали иммуногенные свойства белков, связанных с полимерными биodeградируемыми наногранулами. Описан способ получения сферических наногранул размером 20 мкм путем полимеризации молочной кислоты, а также оптимальный способ их поверхностной активации. Активированные наногранулы использованы для ковалентного связывания модельного белка слияния, содержащего последовательности  $\beta_2$ -микроглобулина человека и зеленого флуоресцентного белка. Показано, что наногранулы способны связывать 3 мкг белка на 1 мг полимера. По данным конфокальной микроскопии и электрофореза, белок прочно сорбируется на поверхности гранул. Мышей линии F1 (СВА х С57BL) внутрибрюшинно иммунизировали наногранулами, модифицированными белком слияния, а также эквивалентной смесью немодифицированных наногранул и свободного белка слияния. Кровь забирали через 2 недели после трехкратной внутрибрюшинной иммунизации. Уровень антител к модельному белку определяли в сыворотке крови мышей при помощи иммуноферментного анализа. Опытная и контрольная группы включали по 39 животных. Достоверность полученных результатов оценивали при помощи критерия Манна–Уитни. Показано, что средний уровень антител в контрольной группе в 1,8 раза превышал таковой в опытной группе. Разница оказалась достоверной ( $p < 0,004$ ). Обсуждается значимость полученных результатов для создания ловушек, способных связывать вирусные частицы в крови и обеспечивать иммунный ответ.

**Ключевые слова:** частицы на основе полимолочной кислоты, «ловушки» вирусов, зеленый флуоресцентный белок, гуморальный иммунный ответ.

## POLYLACTIC ACID NANOPARTICLES INFLUENCE ON IMMUNOGENICITY OF THE PROTEIN BOUND WITH THEM

Polyakov D.S.<sup>a,b,c</sup>, Antimonova O.I.<sup>a</sup>, Sakhabeev R.G.<sup>a</sup>, Grudinina N.A.<sup>a</sup>, Khodova A.E.<sup>c</sup>, Sinitsyna E.S.<sup>c,d</sup>, Korzhikov-Vlakh V.A.<sup>c</sup>, Tennikova T.B.<sup>c</sup>, Shavlovsky M.M.<sup>a,b</sup>

<sup>a</sup>Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

<sup>b</sup>North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov, St. Petersburg, Russian Federation

<sup>c</sup>St. Petersburg State University, St. Petersburg, Russian Federation

<sup>d</sup>Institute of Macromolecular Compound, St. Petersburg, Russian Federation

**Abstract.** We investigated immunogenic properties of proteins bound with nanoparticles. A process for producing spherical nanoparticles having size of 20 microns by polymerization of lactic acid and an optimal method of nanoparticle surface

### Адрес для переписки:

Поляков Дмитрий Степанович  
197376, Россия, Санкт-Петербург, ул. Акад. Павлова, 12,  
ФГБНУ Институт экспериментальной медицины.  
Тел.: +7 (950) 039-98-33 (моб.). E-mail: ravendoctor@mail.ru

### Contacts:

Dmitry S. Polyakov  
197376, Russian Federation, St. Petersburg, Akademika  
Pavlova str., 12, Institute of Experimental Medicine.  
Phone: +7 (950) 039-98-33 (mobile). E-mail: ravendoctor@mail.ru

### Библиографическое описание:

Поляков Д.С., Антимонова О.И., Сахабеев Р.Г., Грудинина Н.А., Ходова А.Е., Сеницына 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. doi: 10.15789/2220-7619-2017-2-123-129

### Citation:

Polyakov D.S., Antimonova 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 // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2017, vol. 7, no. 2, pp. 123–129. doi: 10.15789/2220-7619-2017-2-123-129

Работа выполнена при поддержке гранта РНФ (№ 14-50-00069) и программы «УМНИК» (№ 7128ГУ/2015)

activation were described. Activated nanoparticles were used for covalent binding of model fusion protein comprising sequences of human beta-2 microglobulin and green fluorescent protein. It is shown that the nanoparticles were able to bind 3 micrograms of the protein per 1 mg of the polymer. According to the results of confocal microscopy and electrophoresis the protein is firmly adsorbed on the surface of the granules. F1 (CBA x C57BL) mice were subjected to intraperitoneal immunization with fusion protein modified nanoparticles and equivalent mixture of unmodified nanoparticles and unbound fusion protein. Blood was taken at 2 weeks after three-time intraperitoneal immunization. Antibody level to model protein was determined in mouse sera using enzyme-linked immunosorbent assay. Each of experimental and control groups comprised 39 animals. The validity of the results was evaluated using the Mann–Whitney test. It is shown that the average antibody level in the control group was 1.8 times greater than that in the experimental group. The difference was significant ( $p < 0.004$ ). We discuss the significance of the results in terms of development traps capable to bind virus particles in blood and to provide immune response.

**Key words:** PLA-based particles, virus “traps”, green fluorescent protein, humoral immune response.

## Введение

Вирусные инфекции характеризуются видо- и тканеспецифичностью, что связано в первую очередь с молекулярными механизмами внедрения вирусных частиц в клетки хозяина. Вирусы для проникновения в клетки, где только и возможна их репродукция, чаще всего используют наружные клеточные рецепторы [8]. Уникальность структуры рецепторов обуславливает избирательность их взаимодействия с вирусными частицами. Эта избирательность, по нашему мнению, может служить основой для создания лекарственных средств, способных связывать вирусные частицы и блокировать их распространение в организме. Для этого предполагается получить биodeградебельные полимерные частицы (сферические наногранулы) с фиксированными размерами, модифицированные фрагментами вирусных рецепторов клеток хозяина. Введение таких частиц в кровотоки может способствовать связыванию циркулирующего вируса и направлению его в макрофаги с последующей деградацией. Деградация в макрофагах, по нашему мнению, может способствовать выработке специфических антител. При этом использование таких наночастиц не зависит от антигенного типа вируса. Таким образом, изменение антигенного типа вируса в ходе инфекции не будет препятствовать применению наночастиц с одним и тем же рецептором. Примером такого вируса может быть вирус гепатита С [2].

Данная работа является частью проекта по созданию «ловушек» вирусных частиц. Создание подобных «ловушек» основано на ковалентной иммобилизации на поверхности нано- или микрочастиц на основе полимолочной кислоты (ПМК) рекомбинантного рецептора, специфического для данного вируса. Предполагается, что полученные конъюгаты белок–частица будут способны к связыванию с вирионами, с последующим поглощением образовавшегося комплекса клетками иммунной системы организма. Значительный интерес

с точки зрения иммунологии представляет выяснение влияния частиц на основе ПМК на иммуногенность связанного с ними белка.

В настоящей статье представлены результаты экспериментов, направленных на изучение влияния конъюгирования белка с полимерными частицами, на его иммуногенность. Для этого использована модельная система, включающая наночастицы из полимолочной кислоты и белок слияния  $\beta_2$ -микроглобулина с зеленым флуоресцентным белком ( $\beta_2$ M-sfGFP). Эксперименты проводили на мышах, которым вводили модифицированные наночастицы и контрольные препараты.

Данная работа не только направлена на выяснение степени иммуногенности модифицированных наночастиц, но и носит методический характер, так как для ее реализации пришлось адаптировать и отработать ряд методик.

## Материалы и методы

*Синтез, выделение и очистка рекомбинантного модельного слитого белка  $\beta_2$ -микроглобулина человека с зеленым флуоресцентным белком.* В нашем распоряжении имелась плаزمиды pTRC99a\_P7 (Amersham-Pharmacia), кодирующая sfGFP (green fluorescent protein «superfolder»), помещенный под бактериальным промотором. Кроме того, в отделе молекулярной генетики ФГБНУ ИЭМ были созданы экспрессионные генетические конструкции для синтеза в прокариотической системе белка слияния  $\beta_2$ M-sfGFP [13]. Для получения белков использовали экспрессионный штамм *E. coli* BL21(DE3).

Синтез  $\beta_2$ MSF индуцировали добавлением изопропил- $\beta$ -D-1-тиогалактопиранозида (IPTG) до конечной концентрации 250 мкМ, и культивирование продолжали в течение ночи при 37°C в условиях аэрации. Бактериальные клетки отделяли от среды культивирования путем центрифугирования в течение 15 мин при 10 000g и однократно отмывали PBS с последующим осаждением. Отмытый клеточный осадок ресуспендировали в растворе, содержа-

шем 10 мМ имидазола и 5 мМ 2-меркаптоэтанола. Клетки разрушали ультразвуком (3 кГц, 3 интервала по 30 с) при охлаждении. После разрушения бактериальных клеток суспензию центрифугировали, и профильтрованный через бумажный фильтр супернатант подвергали хроматографической очистке на металл-хелатном никель-агарозном сорбенте (Sigma), согласно стандартному протоколу производителя.

**Получение частиц.** Частицы на основе ПМК получали методом одинарной эмульсии по методике, аналогичной описанной ранее [11]. 300 мг ПМК (молекулярная масса 15 000–30 000) растворяли в 7,5 мл дихлорметана (4 масс./об.%), содержащего 50 мг лецитина. Полученную «масляную» фазу диспергировали в 75 мл охлажденного льдом водного раствора додецилсульфата натрия (1 масс.%) и Lutrol F-68 (5 масс.%) с применением ультразвукового диспергатора (Sonopuls HD2070, Bandelin, Германия) и магнитной мешалки (MR Hei-Mix S, Heidolph, Германия) при скорости перемешивания 750 об./мин. Полученную эмульсию разбавляли в 250 мл охлажденного льдом 1 масс.% водного раствора поливинилового спирта (молекулярная масса 70 000). Дихлорметан удаляли испарением с использованием роторного испарителя (Hei-VAP Precision ML/G3B, Heidolph, Германия) при остаточном давлении 100 мБар в течение 2–3 ч. Образовавшиеся частицы выделяли центрифугированием при 10 000g и промывали водой.

**Связывание флуоресцирующего белка с полимерными частицами на основе полимолочной кислоты.** На первом этапе производили активацию частиц. Генерировали карбоксильные группы на поверхности частиц за счет их обработки 0,1 М раствором NaOH: навеску частиц помещали в пластиковую центрифужную пробирку, прибавляли 0,1 М раствор NaOH, перемешивали при комнатной температуре в течение 30 мин, центрифугировали и отбирали надосадочную жидкость. После этого частицы 4–5 раз промывали водой (центрифугуруя раствор и отбирая надосадочную жидкость).

Следующим этапом связывания являлась активация карбоксильных групп на поверхности частиц с помощью N-гидроксисбензотриазола (HOBT) и гидрохлорида (N-3-диметиламинопропил)-N-этилкарбодиимида (CDI). Реакцию проводили в 0,05 М буферном растворе 2-(N-морфолино)этансульфоновой кислоты (MES), pH 5,6. После этого частицы пятикратно промывали водой, центрифугуруя и отбирая надосадочную жидкость.

Далее осуществляли связывание на поверхности частиц флуоресцентного белка. В 0,1 М боратном буферном растворе, pH 8,4, растворяли белок, перемешивали и выдерживали рас-

твор при комнатной температуре 15–20 мин, далее этот раствор добавляли к частицам, перемешивали на качалке при комнатной температуре 2 ч. Затем частицы пятикратно промывали водой, центрифугуя и отбирая надосадочную жидкость.

**Измерение концентрации белка.** Концентрацию белка измеряли на спектрофотометре Thermo Scientific NanoDrop 2000. Измерение производили непосредственно в капле (2 мкл) жидкости. Поглощение измеряли при длине волны 490 нм.

**Электрофорез в агарозном геле.** Электрофорез проводили в горизонтальных блоках 0,8% агарозного геля. Контроль миграции белков и наночастиц осуществляли по флуоресценции при возбуждении флуоресценции с использованием трансиллюминатора.

**Иммунизация и получение сыворотки крови мышей.** В ходе экспериментов использовали самок-гибридов F1 (CBA x C57BL) массой в среднем 20–25 г (возраст 4–6 месяцев). Животных содержали в виварии при комнатной температуре и режиме освещения 12/12 ч. Корм и вода предоставлялись *ad libitum*. Для изучения влияния исследуемого препарата на иммунный ответ мышам внутрибрюшинно вводили препараты, приготовленные на физиологическом растворе (0,14 М раствор NaCl) в объеме 0,4 мл на животное. Адьюванты и другие вещества, повышающие иммуногенность, не использовали. Таким образом, было проведено 3 иммунизации с интервалами по 2 недели. Забор крови мышей осуществляли из щечной вены через 13 дней после третьей иммунизации, для чего использовали скарификаторы одноразовые стерильные с боковым копьём (МИЗ Медбелрос, Республика Беларусь).

**Иммуноферментный анализ.** В лунки 96-луночного планшета вносили по 100 мкл 0,05% раствора глутарового альдегида в PBS. Инкубацию проводили при 37°C в течение 1 ч. Удаляли из лунок глутаровый альдегид, и в лунки одной половины планшета вносили по 100 мкл раствора sfGFP в PBS с концентрацией 5 мкг/мл, а в лунки другой половины — PBS. Инкубировали при 26°C и непрерывном встряхивании на горизонтальном шейкере для планшетов (Biosan, Латвия) в течение 1 ч. В лунки планшета вносили по 200 мкл 3% раствора обезжиренного молока (Fluka, США) в PBS с добавлением 0,5% Tween 20 (PBST) для блокирования неспецифического связывания. Инкубацию проводили при 26°C и непрерывном встряхивании на горизонтальном шейкере для планшетов в течение 1 ч. В лунки планшета вносили сыворотки крови мышей в 3% растворе молока в PBST в различных разведениях. Каждую сыворотку вносили в трех или двух

разведениях (1:2000, 1:1000 и 1:500 или 1:1000 и 1:500) в двух повторностях на каждую половину планшета в объеме 100 мкл на лунку. Инкубацию проводили при 26°C и непрерывном встряхивании на горизонтальном шейкере для планшетов в течение 1 ч. Лунки планшета промывали 3 раза по 300 мкл PBST при помощи автоматического планшетного промывателя (Bio-Rad, США). В лунки планшета вносили специфические вторые антитела, конъюгированные с пероксидазой хрена (Goat anti Mouse-HRP, Abscam, Великобритания), в разведении 1:50 000 в 3% растворе молока в PBST в количестве 100 мкл на лунку. Инкубацию проводили при 26°C и непрерывном встряхивании на горизонтальном шейкере для планшетов в течение 1 часа. Лунки планшета промывали 3 раза по 300 мкл PBST. В лунки планшета вносили по 100 мкл проявителя, приготовленного следующим образом: 5 мг ТМБ растворяли в 1 мл ацетонитрила. Далее доводили объем до 11 мл 0,1 М цитрат-фосфатным буфером, pH 4,0. Непосредственно перед внесением в планшет в раствор проявителя добавляли 1 мкл 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> с конечной концентрацией 0,0027%. Инкубацию проводили при 26°C и непрерывном встряхивании на горизонтальном шейкере для планшетов в течение 10 мин в темноте. Реакцию останавливали добавлением в лунки по 50 мкл 1 М H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> и встряхивали планшет на горизонтальном шейкере для планшетов в течение 1 мин. Измеряли поглощение в лунках планшета при длине волны 450 нм с помощью мультимодального ридера CLARIOstar (BMG LABTECH, Германия).

*Статистическая обработка.* Данные представлены в виде средних значений со стандартными отклонениями. При построении рисунка использовали программу Statistica 6.0. Для подтверждения статистически значимых различий между группами использовали критерий Манна–Уитни.

*Исследование полученного конъюгата наночастиц и B2MSF при помощи конфокальной микроскопии.* Конфокальные изображения получали с использованием инвертированного конфокального лазерного сканирующего микроскопа «LSM 510 Meta» (Zeiss, Германия), с иммерсионным объективом C-Apochromat 40x/1.2 W Korr UV-VIS-IR M27. Флуоресценцию β<sub>2</sub>M-sfGFP детектировали с использованием оптического фильтра 505 нм при возбуждении флуоресценции лазером с длиной волны 488 нм. В проходящем свете изображения получали при помощи метода дифференциально-интерференционного контраста. Обработку изображений осуществляли при помощи прилагаемого к микроскопу программного обеспечения «LSM 510».

## Результаты

В качестве модели для выяснения влияния наночастиц из полимолочной кислоты на иммуногенность связанного с ними белка был выбран созданный нами ранее [12, 13] рекомбинантный белок слияния β<sub>2</sub>-микроглобулина человека и зеленого флуоресцентного белка (β<sub>2</sub>M-sfGFP). Преимущество данного белка состоит в том, что он, во-первых, синтезируется и выделяется при помощи доступных стандартных методов. Во-вторых, обладает флуоресценцией, свойственной зеленому флуоресцентному белку. Это создает удобство работы за счет возможности измерять количество белка не только по поглощению при 280 нм, но и по поглощению при 490 нм, а также по флуоресценции, которую можно оценивать флуоресцентной микроскопией. Указанные преимущества зеленых белков использовались в нашей работе ранее [5]. Такими свойствами обладает и сам зеленый флуоресцентный белок (GFP), однако попытки связывания его с наночастицами не привели к приемлемым результатам. По-видимому, это связано с компактной структурой молекулы GFP [9]. При этом добавление аминокислотной последовательности β<sub>2</sub>-микроглобулина к последовательности GFP не нарушает способности к флуоресценции, но существенно облегчает связывание с наночастицами. Это связано с тем, что аминогруппа у зеленого белка, возможно, «упакована» внутри сложной структуры данного белка. β<sub>2</sub>-микроглобулин играет роль «мостика» между наночастицами и зеленым белком. Это обстоятельство является третьей из перечисляемых причин, по которым β<sub>2</sub>M-sfGFP в итоге выбран нами в качестве модельного белка в описываемых экспериментах. В-четвертых, в нашем коллективе есть опыт работы с β<sub>2</sub>-микроглобулином [1, 3, 4, 6, 7], что было важно при планировании большого числа последовательных действий, необходимых для реализации поставленной задачи.

Был получен в достаточном количестве и очищен модельный β<sub>2</sub>M-sfGFP (рис. 1). Рекомбинантный белок получали из клеток *E. coli* штамма BL21(DE3), трансформированных экспрессионной конструкцией pTRCb2msf [12, 13]. В результате для данной работы было синтезировано и очищено 23 мг целевого белка из 3 л бактериальной культуры.

Результаты электрофоретического разделения белка sfGFP, белка слияния β<sub>2</sub>M-sfGFP, немодифицированных наночастиц в агарозном геле представлены на рисунке 1.

Белок слияния β<sub>2</sub>M-sfGFP, также как и контрольный белок, обладает флуоресцентными свойствами. Наночастицы в гель не проходят (дорожка 1). На дорожке 1 не видно бендов, со-



ответствующих зеленым белкам, следовательно, препарат наночастиц не содержит несвязавшегося целевого белка.

В качестве основы для создания наночастиц использовали полимолочную кислоту. Получение частиц на основе синтезированного полимера осуществляли с использованием метода одинарной эмульсии в Институте высокомолекулярных соединений РАН. Образовавшиеся частицы имели сферическую форму и диаметр от 200 нм до 20 мкм. 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 результате полученные конъюгаты наночастиц и  $\beta_2$ M-sfGFP имели диаметр до 10 мкм, в редких случаях до 20 мкм и обладали зеленой флуоресценцией (рис. 2, III обложка). Методом спектрофотометрии была установлена связывающая способность наночастиц по отношению к белку  $\beta_2$ M-sfGFP, она составляла 3 мкг белка на 1 мг наночастиц.

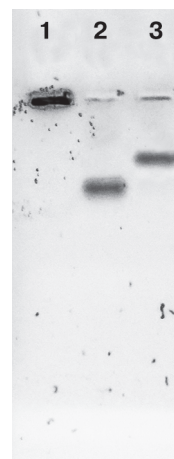
Была осуществлена лазерная сканирующая микроскопия (ЛСМ) препарата наночастиц, не имеющих на своей поверхности белков слияния. При этом свечения обнаружено не было (рис. 3, III обложка). Также при помощи ЛСМ нами были зарегистрированы флуоресцирующие структуры конъюгата наночастиц с белком слияния  $\beta_2$ M-sfGFP, представленные на рисунке 2.

Полученные результаты свидетельствует о связывании наночастиц с модельным белком. Свечение образует именно конъюгат наночастиц с  $\beta_2$ M-sfGFP, а не сами частицы. Зеленый белок, связанный с наночастицами, не теряет способности к флуоресценции.

Была проведена иммунизация 78 мышей, разделенных на 2 равные по численности группы. Группе «Опыт» внутрибрюшинно вводили конъюгат наночастиц и  $\beta_2$ M-sfGFP из расчета 1 мкг белка на иммунизацию одной мыши. Группе «Контроль» аналогично вводили смесь, содержащую 1 мкг несвязанного  $\beta_2$ M-sfGFP и соответствующее количество немодифицированных наночастиц. Через 2 недели после третьей иммунизации получали образцы венозной крови всех мышей. Титр антител против модельного белка в сыворотках определяли посредством иммуноферментного анализа.

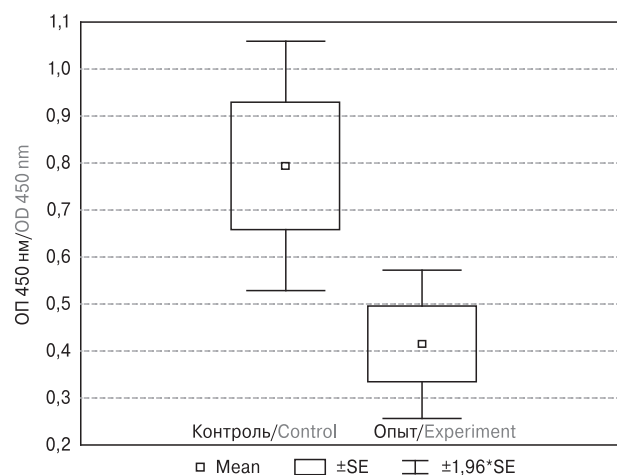
Для учета фонового сигнала, обусловленного неспецифическими взаимодействиями первых и вторых антител, из сигналов лунок, содержащих антиген sfGFP, вычитали сигналы соответствующих лунок, которые sfGFP не содержали.

В результате статистической обработки данных ИФА (рис. 4, табл.) выяснилось, что в группе мышей «Опыт» содержание иммуноглобу-



**Рисунок 1. Электрофоретическое разделение модифицированных зеленым белком наночастиц (дорожка 1), белка sfGFP (дорожка 2), белка слияния  $\beta_2$ M-sfGFP (дорожка 3) в 0,5% агарозном геле**

Figure 1. Nanoparticles modified by green protein (path 1), sfGFP (path 2), a merge protein  $\beta_2$ M-sfGFP (path 3) in 0,5% agarose gel electrophoretic analysis



**Рисунок 4. Результаты ИФА иммуноглобулинов против модельного белка в сыворотках крови мышей**

Figure 4. Antibodies against the model protein in mice blood serum ELISA results

Mean — полученные средние значения;  
SE — ошибка возведенного в квадрат среднего значения.  
Mean — the mean values obtained;  
SE — error squared average value.

**Таблица. Сравнение групп «Опыт» и «Контроль» с использованием критерия Манна–Уитни**

Table. Comparison of the “Test” and “Control” groups by the Mann–Whitney U-test

Сумма/Sum Контроль/Control	Сумма/Sum Опыт/Test	U	Z	p
6228,5	4649,5	1948,5	2,9	0,0036

линов против модельного белка было значительно ниже, чем в группе «Контроль». При этом следует отметить значительное различие в содержании иммуноглобулинов между группами, а также высокую статистическую достоверность ( $p < 0,004$ ) данного различия.

## Обсуждение

Результаты экспериментов показали, что более выраженный ответ в плане количественного содержания антител в сыворотке крови имеет место в случае иммунизации смесью белка и немодифицированных наночастиц. Этот результат можно объяснить следующим образом. Возможно, наночастицы элиминируются из брюшной полости в результате их захвата макрофагами. Макрофаги, обеспечивая деградацию связанных с наночастицами белков, способствуют представлению антигенных детерминант В-лимфоцитам с последующим антительным ответом. Такой сценарий, скорее всего, имеет место после первой иммуниза-

ции. При последующих иммунизациях захват наночастиц макрофагами может, напротив, ослаблять поступление антигена в лимфоциты и, таким образом, снижать эффективность секреции антител лимфоцитами. Иммунизация растворимым антигеном, возможно, менее эффективна после первой внутрибрюшинной иммунизации, но способствует более эффективной секреции антител после повторных иммунизаций. Так как в наших экспериментах анализ содержания антител производился после третьей иммунизации, то, вполне вероятно, что первый этап иммунизации мы просто не увидели.

Аналогичных работ, описывающих влияние наночастиц на иммуногенность, крайне мало. В работе Chong C.S. et al. [10] было установлено, что более сильный иммунный ответ у мышей вызывал препарат, содержащий модельный белок (HВс-Ag). Менее иммуногенной была неконъюгированная смесь наночастиц и белка. И наименьший иммунный ответ вызывал конъюгат наночастиц и белка.

## Список литературы/References

1. Антимонова О.И., Грудинина Н.А., Егоров В.В., Поляков Д.С., Ильин В.В., Шавловский М.М. Взаимодействие красителя конго красный с фибриллами лизоцима, бета-2-микроглобулина и транстиретина // Цитология. 2016. Т. 58, № 2. С. 156–163. [Antimonova O.I., Grudinina N.A., Egorov V.V., Polyakov D.S., Ijlin V.V., Shavlovsky M.M. Interaction of the dye congo red with fibrils of lysozyme, beta-2-microglobulin and transthyretin. *Tsitologiya = Cell and Tissue Biology*, 2016, vol. 58, no. 2, pp. 156–163. (In Russ.)]
2. Иванов А.В., Кузякин А.О., Кочетков С.Н. Молекулярная биология вируса гепатита С // Успехи биологической химии. 2005. Т. 45. С. 37–86. [Ivanov A.V., Kuzyakin A.O., Kochetkov S.N. Molecular biology of hepatitis C virus. *Uspekhi Biologicheskoi Khimii = Biological Chemistry Reviews*, 2005, vol. 45, pp. 37–86. (In Russ.)]
3. Поляков Д.С., Грудинина Н.А., Соловьев К.В., Егоров В.В., Сироткин А.К., Алейникова Т.Д., Тотолян 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. Beta-2-microglobuline amyloidosis: fibrillogenesis of natural and recombinant human beta-2-microglobulines. *Meditsinskii akademicheskii zhurnal = Medical Academical Journal*, 2010, vol. 10, no. 2, pp. 40–49. (In Russ.)]
4. Поляков Д.С., Грудинина Н.А., Соловьев К.В., Егоров В.В., Сироткин А.К., Алейникова Т.Д., Тотолян Арег А., Шавловский М.М. Получение рекомбинантного  $\beta$ 2-микроглобулина человека и его фибриллогенез при низких и нейтральных значениях pH // Молекулярная медицина. 2011. № 2. С. 36–39. [Polyakov D.S., Grudinina N.A., Solovyov K.V., Egorov V.V., Sirotkin A.K., Aleinikova T.D., Totolian Areg A., Shavlovsky M.M. Production of recombinant human  $\beta$ 2-microglobulin and its amyloid fibril formation at acidic and neutral pH. *Molekulyarnaya meditsina = Molecular Medicine*, 2011, no. 2, pp. 36–39. (In Russ.)]
5. Поляков Д.С., Сахабеев Р.Г., Шавловский М.М. Частичная денатурация рекомбинантного белка для его аффинного выделения // Прикладная биохимия и микробиология. 2016. Т. 52, № 1. С. 122–127. [Polyakov D.S., Sakhabeyev R.G., Shavlovsky M.M. Partial denaturation of recombinant protein for affinity purification. *Prikladnaya biokhimiya i mikrobiologiya = Applied Biochemistry and Microbiology*, 2016, vol. 52, no. 1, pp. 122–127. (In Russ.)]
6. Поляков Д.С., Тотолян Арег А., Шавловский М.М. Получение природного бета-2-микроглобулина человека // Молекулярная медицина. 2010. № 6. С. 39–43. [Polyakov D.S., Totolian Areg A., Shavlovsky M.M. Isolation of native human  $\beta$ 2-microglobulin. *Molekulyarnaya meditsina = Molecular Medicine*, 2010, no. 6, pp. 39–43. (In Russ.)]
7. Поляков Д.С., Шавловский М.М. Молекулярные основы  $\beta$ 2-микроглобулинового амилоидоза // Медицинский академический журнал. 2014. Т. 14, № 1. С. 24–41. [Polyakov D.S., Shavlovsky M.M. Molecular basis of  $\beta$ 2-microglobulin amyloidosis. *Meditsinskii akademicheskii zhurnal = Medical Academical Journal*, 2014, vol. 14, no. 1, pp. 24–41. (In Russ.)]
8. Berka U., Hamann M.V., Lindemann D. Early events in foamy virus — host interaction and intracellular trafficking. *Viruses*, 2013, vol. 5, pp. 1055–1074.
9. Bulina M.E., Chudakov D.M., Mudrik N.N., Lukyanov K.A. Interconversion of anthozoa GFP-like fluorescent and non-fluorescent proteins by mutagenesis. *BMC Biochem.*, 2002, vol. 3, p. 7.
10. Chong C.S., Cao M., Wong W.W., Fischer K.P., Addison W.R., Kwon G.S., Tyrrell D.L., Samuel J. Enhancement of T helper type 1 immune responses against hepatitis B virus core antigen by PLGA nanoparticle vaccine delivery. *J. Control Release*, 2005, no. 102 (1), pp. 85–99. doi: 10.1016/j.jconrel.2004.09.014

11. Korzhikov V., Averianov I., Litvinchuk E., Tennikova T. Polyester-based microparticles of different hydrophobicity: the patterns of lipophilic drug entrapment and release. *J. Microencapsul.*, 2016, vol. 33 (3), pp. 199–208. doi: 10.3109/02652048.2016.1144818
12. Solovyov K.V., Kern A.M., Grudinina N.A., Aleynikova T.D., Polyakov D.S., Morozova I.V., Shavlovsky M.M. Genetic structures and conditions of their expression, which allow receiving native recombinant proteins with high output. *Int. J. Biomed.*, 2012, vol. 2, iss. 1, pp. 45–49.
13. 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  $\beta$ 2M-sfGFP. *Prep. Biochem. Biotechnol.*, 2011, vol. 41, iss. 4, pp. 337–349.

**Авторы:**

**Поляков Д.С.**, к.м.н., научный сотрудник отдела молекулярной генетики ФГБНУ Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия; ассистент кафедры медицинской генетики СЗГМУ им. И.И. Мечникова ФГБОУ ВО Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова, Санкт-Петербург, Россия; научный сотрудник межкафедральной лаборатории биомедицинской химии Института химии ФГБОУ ВО Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия;

**Антимонова О.И.**, младший научный сотрудник и аспирант отдела молекулярной генетики ФГБНУ Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия;

**Сахабеев Р.Г.**, аспирант отдела молекулярной генетики ФГБНУ Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия;

**Грудина Н.А.**, к.б.н., старший научный сотрудник отдела молекулярной генетики ФГБНУ Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия;

**Ходова А.Е.**, студентка 6-го курса магистратуры ФГБОУ ВО Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия;

**Синицына Е.С.**, к.х.н., научный сотрудник межкафедральной 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 межкафедральной лаборатории биомедицинской химии Института химии ФГБОУ ВО Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия;

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

**Шавловский М.М.**, д.м.н., профессор, зав. лабораторией молекулярной генетики человека отдела молекулярной генетики ФГБНУ Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия; профессор кафедры медицинской генетики СЗГМУ им. И.И. Мечникова, Санкт-Петербург, Россия.

**Authors:**

**Polyakov D.S.**, PhD (Medicine), Researcher, Department of Molecular Genetics, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation; Assistant Professor, Department of Medical Genetics, North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov, St. Petersburg, Russian Federation; Researcher, Interdepartmental Laboratory of Biomedical Chemistry, Institute of Chemistry, St. Petersburg State University, St. Petersburg, Russian Federation;

**Antimonova O.I.**, Junior Researcher and PhD Student, Department of Molecular Genetics, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation;

**Sakhabeev R.G.**, PhD Student, Department of Molecular Genetics, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation;

**Grudinina N.A.**, PhD (Biology), Senior Researcher, Department of Molecular Genetics, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation;

**Khodova A.E.**, Masters Degree Student, St. Petersburg State University, St. Petersburg, Russian Federation;

**Sinitsyna E.S.**, PhD (Chemistry), Researcher, Interdepartmental 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 Compound, Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, Russian Federation;

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

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

**Shavlovsky M.M.**, PhD, MD (Medicine), Professor, Head of the Laboratory of Human Molecular Genetics, Department of Molecular Genetics, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation; Professor of the Department of Medical Genetics, St. Petersburg, Russian Federation.

Поступила в редакцию 08.03.2016  
Отправлена на доработку 20.04.2016  
Принята к печати 20.01.2017

Received 08.03.2016  
Revision received 20.04.2016  
Accepted 20.01.2017