

УДК 57.083

ВЛИЯНИЕ КОНЬЮГАТА БРУЦЕЛЛИНА С НАНОЧАСТИЦАМИ ЗОЛОТА НА ИММУННЫЙ ОТВЕТ И ФАГОЦИТОЗ БРУЦЕЛЛ

© 2025 г. Л. А. Дыкман¹, *, С. А. Староверов¹, Р. Д. Выршиков¹

¹Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов — обособленное структурное подразделение
Федерального государственного бюджетного учреждения науки Федерального исследовательского центра
“Саратовский научный центр Российской академии наук”, Саратов, 410049 Россия

*e-mail: dykman_l@ibppm.ru

Поступила в редакцию 28.12.2024 г.

После доработки 10.01.2025 г.

Принята к публикации 12.01.2025 г.

Получен конъюгат наночастиц золота (15 нм) с бруцеллином — полисахаридно-белковым комплексом, выделенным из вакцинного штамма бруцелл. Полученным конъюгатом проводили вакцинацию белых мышей. Препарат вводили внутривенно трехкратно с интервалом в 7 дней. После чего всем животным инъецировали суспензию клеток вакцинного штамма *Brucella abortus* 82. С использованием клеточного пролиферативного теста показано, что в группе животных, иммунизированных конъюгатом бруцеллина с наночастицами золота, фагоцитирующие клетки и спленоциты обладали более высокой метаболической активностью по сравнению с группой, иммунизированной нативным антигеном. Причем эта тенденция усиливалась после введения вакцинного штамма. Наиболее высокий титр антител был у животных, иммунизированных конъюгатом бруцеллина с наночастицами золота (1 : 2560 исходно и 1 : 10240 после стимуляции вакцинным штаммом). Важно, что при проведении опсонофагоцитарной реакции оказался весьма высоким уровень опсонизирующих антител, которые способствуют нейтрализации персистирующих в организме животных бактерий.

Ключевые слова: наночастицы золота, бруцеллин, иммунизация, антитела, пролиферативная активность, опсонофагоцитарная реакция

DOI: 10.31857/S0555109925030089 EDN: DRVMWC

Персистенция (от лат. *persistere* — оставаться, упорствовать) — сохранение микроорганизмов в функционально активном состоянии в клетках макроорганизма или культур ткани за пределами тех сроков, которые характерны для острой инфекции. При персистенции микробная клетка пытается защитить себя при помощи разнообразных “экранирующих” структур или путем выделения секретруемых факторов, инактивирующих механизмы клеточной и гуморальной защиты организма. Кроме того, персистирующие бактерии способны к образованию форм с отсутствием (дефектом) клеточной стенки и антигенной мимикрией. В более общем смысле длительное переживание бактерий в организме хозяина, носящее название персистенция, следует рассматривать как форму симбиоза микробов и организма животных и человека [1].

Персистеры (персистирующие бактерии) — это метаболически неактивные формы бактерий,

которые могут быть толерантны к антибиотикам и иммунной системе организма-хозяина, они устойчивы к стрессовым воздействиям. С наличием персистирующих клеток связывают хроническое течение многих заболеваний, не поддающихся стандартным методам лечения [2].

О существовании персистирующих клеток впервые заявил Джозеф Уорвик Биггер в 1944 г. [3]. Работая с недавно внедренным тогда в лечебную практику пенициллином, он обнаружил, что пенициллин разрушал не все клетки стафилококков. В дальнейшем персистирующие клетки на долгие годы выпали из поля зрения ученых. И лишь спустя 40 лет в 1980 гг. к этой проблеме вернулись исследователи [4]. В 90 гг. годы прошлого столетия на волне возникшего интереса к изучению микробных биопленок вновь вспомнили о персистирующих клетках [5]. В настоящее время интерес к изучению персистирующих клеток ми-

кроорганизмов определяется их важностью для клинической практики.

Наличие персистирующих форм обнаружено у большого количества микроорганизмов, в частности, патогенных для человека и животных представителей родов: *Staphylococcus*, *Salmonella*, *Shigella*, *Brucella*, *Micobacterium*, *Escherichia*, *Pseudomonas*, *Streptococcus*, *Rickettsia*, *Chlamydia*, *Listeria*, *Coxiella*, *Legionella* и др. Среди персистеров особо выделяют группу внутриклеточных паразитов, которые способны вызывать персистирующую, пожизненно текущую хроническую инфекцию. При этом происходит репликация возбудителя внутри организма-хозяина, несмотря на формирование у последнего иммунного ответа. Эти бактериальные внутриклеточные паразиты обладают стратегией “убегания” от иммунного ответа, что играет ключевую роль в развитии хронической инфекции. Реализация этой стратегии направлена на ингибирование действия факторов врожденного иммунитета. Эти микробы способны регулировать метаболизм макрофагов под свои потребности в процессе персистирования в них [6]. Наиболее часто к внутриклеточным паразитам относят бактерии родов *Rickettsia*, *Chlamydia*, *Shigella*, *Listeria*, *Micobacterium*, *Brucella* [7].

Brucella — род бактерий из семейства *Brucellaceae* класса альфа-протеобактерий. Бруцеллез — зоонозная инфекция, вызываемая микроорганизмами рода бруцелл, передающаяся от больных животных человеку, характеризующаяся множественным поражением органов и систем организма [8]. Бруцеллы обладают высокой проникающей способностью, внедряются в организм даже через неповрежденные слизистые оболочки пищеварительного тракта, легких, глаз, кожу, распространяются по лимфоток и депонируются в лимфатических узлах. Бруцеллы сохраняются внутри фагоцитов, выделяя низкомолекулярные факторы, ингибирующие слияние фагосом с лизосомами. Внутри фагоцитов бруцеллы могут переходить в L-формы и длительно персистировать [9].

Бактериологическая диагностика бруцеллеза затруднена тем, что рост этих микроорганизмов крайне медленный (до 2 месяцев), и посев представляет опасность для лабораторного персонала из-за высокой вирулентности бруцелл. Наиболее распространенные иммунологические тесты — агглютинирующие реакции, иммуноферментный анализ (ИФА), реакции прямой и непрямой иммунофлуоресценции [10, 11]. Кроме того, используют кожные аллергические пробы с применением бруцеллина — полисахаридно-белкового комплекса, выделенного из вакцинного штамма *Brucella abortus* [12]. Внутрикожное введение аллергена у больного бруцеллезом вызывает развитие местной реакции (отек, гиперемия, болезненность). У здоровых лиц местная реакция на введение аллергена в течение 24–48 ч должна отсутствовать. По существу это

аналог туберкулиновой пробы, широко используемой для диагностики туберкулеза. Отметим, что туберкулин, конъюгированный с наночастицами золота (НЧЗ), был использован для иммуноанализа микобактерий и вакцинации животных [13].

Также затруднены профилактические мероприятия, поскольку массовые профилактические прививки животных не дали ожидаемого результата [14]. Кроме того, предложенные ветеринарные вакцины патогенны для человека. Тем не менее, несколько ослабленных штаммов бруцелл и выделенных бактериальных фракций применяли в качестве прототипов вакцин для людей [15, 16]. В настоящее время не существует лицензированных вакцин против бруцеллеза для использования человеком, и только несколько лицензированных живых вакцин против бруцеллеза доступны для использования у животных [17].

При производстве вакцин существует потребность в эффективных носителях для доставки антигенов (Аг) в иммунокомпетентные клетки. В частности, вирусоподобные частицы, липосомы, самоорганизующиеся белковые частицы, полимерные частицы (поли-эпсилон-капролактона, поли(этилен-малеинового ангидрида), поли(молочной-со-гликолевой кислоты), хитозана), мицеллы и неорганические микро- и наночастицы могут выступать в качестве таких носителей [18–21] и/или адъювантов [22]. Особенно важным представляется использование наночастиц при иммунизации для доставки Аг внутриклеточных паразитов (*Micobacterium*, *Rickettsia*, *Burkholderia*) [23–25].

Одними из эффективных наноносителей Аг, предложенных для иммунизации и вакцинации, являются НЧЗ. Опубликовано большое количество работ, в которых НЧЗ были использованы для получения антител (Ат) к целому ряду гаптенов и полноценных Аг. Были обнаружены адъювантные свойства, присущие самим НЧЗ. В настоящее время с использованием НЧЗ ведутся работы по созданию новых диагностических тестов и вакцин против вирусных, бактериальных, паразитарных, грибковых инфекций [26, 27]. Некоторые кандидные вакцины на основе НЧЗ успешно прошли фазу 1 клинических испытаний [28].

Конъюгаты НЧЗ с поверхностными Аг бруцелл (О-специфический полисахарид, горячий солевой экстракт из *B. abortus*) применяли для получения антибруцеллезных Ат, которые использовали в твердофазных иммунохимических тест-системах для диагностики бруцеллеза [29]. В предыдущих исследованиях были использованы НЧЗ в качестве иммуномодуляторов при иммунизации и вакцинации Аг, выделенными из *B. abortus*. В результате были получены Ат с высоким титром, которые были применены в дот-иммуноанализе бруцелл. Более того, мыши, иммунизированные НЧЗ в комплексе

с Ag *B. abortus*, оказались более устойчивыми к заражению, чем мыши, вакцинированные по другим схемам [30].

Цель настоящего исследования — получение конъюгатов НЧЗ с бруцеллином; иммунизация полученным конъюгатом лабораторных животных с оценкой показателей клеточного и гуморального иммунитета; изучение влияния нативного бруцеллина и его конъюгата с НЧЗ на персистенцию бруцелл.

МЕТОДИКА

Выделение антигена. В работе использовали коммерческий препарат бруцеллин (“Бруцеллин ВИЭВ”, ФКП “Щелковский биокомбинат”, Россия). Препарат представляет собой стерильную прозрачную жидкость коричневатого-желтого цвета без хлопьев, осадка и механических примесей, содержащий специфические вещества, выделенные из бруцелл вакцинного штамма *B. abortus* B-1, находящегося в R-форме, в 0.9%-ном растворе NaCl. Для выделения Ag препарат осаждали сульфатом аммония (70% насыщения) и диализовали против 0.01 М фосфатно-солевого буфера (ФСБ), pH 7.0. Полученный антигенный препарат конъюгировали с НЧЗ (15 нм) и проводили иммунизацию животных.

Синтез наночастиц золота. Золотые наносферы получали по методу Френса [31], используя реакцию восстановления HAuCl_4 цитратом натрия. Нагревали 240 мл деионизированной воды в колбе Эрленмейера с обратным водяным холодильником до закипания. Добавляли 2.5 мл 1%-ного водного раствора HAuCl_4 (“Sigma-Aldrich”, США). Затем вносили в реакционную смесь 7.75 мл 1%-ного цитрата натрия (“Fluka”, Швейцария) и включали интенсивное перемешивание до образования золь интенсивно красного цвета.

Получение конъюгатов наночастиц золота с антигеном. Перед конъюгацией Ag с НЧЗ (15 нм) определяли “золотое число” (минимальное количество Ag, защищающего золь от солевой агрегации). Для этого в 96-луночном микротитровальном планшете двукратно по 20 мкл титровали раствор выделенного Ag с начальной концентрацией 1 мг/мл. В каждую лунку добавляли по 200 мкл 15-нм НЧЗ ($A_{520} = 1.0$) и по 20 мкл 1.7 М NaCl и определяли минимальную стабилизирующую концентрацию. Золотое число для выделенного Ag составило 25 мкг/мл. Конъюгацию проводили простым смешением реагентов без использования сшивающих агентов, используя концентрацию Ag на 20% превышающую золотое число. Аналогично проводили процедуру конъюгации НЧЗ со стафилококковым белком А (“Sigma-Aldrich”, США).

Иммунизация животных. Для иммунизации использовали белых лабораторных беспородных мышей. Животные были разделены на 4 группы по 6

особей в каждой. Первой группе вводили конъюгат Ag с НЧЗ, второй — нативный Ag, третьей — раствор НЧЗ, четвертой (контрольной) — ФСБ. Препарат вводили трехкратно с интервалом в 7 сут, после чего всем животным внутрибрюшинно инъецировали взвесь вакцинного штамма *B. abortus* 82 (100 мкл, 10^9 кл./мл). Через 7 дней после введения микробной взвеси проводили эвтаназию животных и отбирали образцы биологического материала для исследования.

Выделение перитонеальных макрофагов и лимфоцитов селезенки. Для выделения перитонеальных макрофагов [32] животных декапитировали, затем фиксировали на спине. Делали разрез по срединной линии передней брюшной стенки и осторожно отсекали кожный лоскут, не нарушая целостности брюшины. Через прокол иглой, соединенной со шприцом, в брюшную полость вводили ФСБ (pH 7.2) в объеме 10–15 мл. Осторожно массировали переднюю брюшную стенку. Через 5–7 мин через надрез в брюшине пастеровской пипеткой собирали содержимое, сливали в пробирку через нейлоновый фильтр. Проводили 3-кратную отмывку клеток центрифугированием в ФСБ при 750 g. После центрифугирования клетки перерастворяли в 1 мл ФСБ и проводили подсчет их количества на гематологическом анализаторе HaemaScreenvet (“Hospitex Diagnostics”, Италия), учитывая общий пул полиморфноядерных клеток.

Для выделения лимфоцитов селезенки [33] делали разрез брюшины вдоль белой линии и извлекали селезенку. Селезенку измельчали ножницами. Кусочки тканей перетирали через мелкое сито в чашку Петри со стерильным ФСБ. Полученную суспензию центрифугировали в градиенте плотности фикал-урографин. Собирали кольцо лимфоцитов в отдельную пробирку. Лимфоциты отмывали трехкратным центрифугированием в ФСБ (pH 7.2) при 750 g 10 мин. Осадок клеток перерастворяли в 1 мл ФСБ. Количественный анализ спленоцитов проводили на гематологическом анализаторе HaemaScreenvet (“Hospitex Diagnostics”, Италия).

Определение пролиферативной активности клеток. Оценку пролиферативной активности перитонеальных макрофагов и спленоцитов проводили с использованием WST-8—теста [34] с применением набора для оценки пролиферации клеток ССК-8 (“Servicebio”, Китай). Выделенные мононуклеарные клетки от иммунизированных животных разводили до концентрации 5×10^6 кл./мл в среде для культивирования, содержащей 100 мл среды RPMI-1640 (“Sigma-Aldrich”, США), 10 мл эмбриональной телячьей сыворотки, 1 мл 2 М L-глутамин (“Sigma-Aldrich”), 100 мкл 4%-ного раствора гентамицина, 25 мкл буфера HEPES (“Sigma-Aldrich”). Опытные и контрольные клетки добавляли в 96-луночный планшет по 200 мкл на лунку (по 4 лунки на каждый образец). После этого в каждую лунку вносили по 20 мкл Ag до ко-

нечной концентрации 20 мкг. Планшет инкубировали в CO₂-инкубаторе ("New Brunswick Scientific", США) при 37°C с 5% CO₂ в течение 72 ч. Затем во все лунки добавляли по 20 мкл раствора WST-8 и инкубировали планшет еще 3.5 ч. Осторожно отбирали 170 мкл надосадка из лунок и добавляли по 150 мкл диметилсульфоксида для растворения образовавшихся гранул формазана. Содержимое лунок тщательно пипетировали либо использовали микрошейкер для встряхивания планшетов. Оптическую плотность раствора измеряли на спектрофотометре Genesys 10S UV Vis ("Thermo Fisher Scientific", США) при длине волны 560 нм.

Определение титра антител. Титр полученных Ат в сыворотке крови определяли с помощью твердофазного ИФА по стандартной методике [35] с применением меченных пероксидазой хрена Ат к IgG мыши ("Jackson ImmunoResearch", Великобритания), используя бруцеллин в качестве иммобилизованного Аг. Результаты реакции регистрировали на микропланшетном спектрофотометре Plate Screen ("Hospitex Diagnostics", Италия). При постановке ИФА сыворотку от исследуемых животных разводили в 10 раз, после чего проводили ее двойное титрование.

Дот-иммуноанализ. Дот-иммуноанализ проводили по следующей методике [36]: в качестве образцов на поливинилиденфторидную мембрану, обработанную метанолом, в виде серии точек наносили по 1 мкл двойных разведений бруцеллина (начальная концентрация 1 мг/мл) и инкубировали в течение ночи при 4°C для фиксации Аг. Затем проводили блокирование мембраны с нанесенным на нее Аг в течение 1 ч 2%-ным сухим молоком, разведенным в 10 мМ ФСБ, pH 7.2. После этого мембрану инкубировали на шейкере при комнатной температуре в течение 1 ч в растворе антисывороток, разведенных 1 : 100. Далее мембрану трижды отмывали в ФСБ от неспецифически связавшихся Ат и погружали в раствор конъюгата НЧЗ со стафилококковым белком А ($A_{520} = 1$). Через 5–60 мин, конъюгат связывался с комплексом Аг–Ат, что можно было визуальное наблюдать в виде серии красных пятен.

Опсонифагоцитарная реакция. Для оценки активности фагоцитоза иммунных сывороток, полученных от контрольной и экспериментальных групп животных, вакцинированных бруцеллином, была использована опсонифагоцитарная реакция [37]. Для проведения реакции 25 мкл сыворотки, полученной от каждой группы иммунизированных мышей, вносили в первые лунки 96-луночного планшета. Затем в другие лунки добавляли около 25 мкл раствора Хэнкса, и проводили серийные (двойные) разведения каждой из сывороток. После этого во все лунки добавляли 20 мкл буфера, содержащего агарозу (0.1 мг/мл). На следующем этапе в лунки вносили 10 мкл суспензии вакцинного штамма *B. abortus* 82 (~2000 колониеобразующих

единиц, КОЕ на лунку) и планшет помещали в термостат при 37°C на 5 мин. Затем в каждую лунку добавляли 24 мкл комплемента (конечная концентрация 12.5%) и планшет помещали на автоматический шейкер на 30 мин при 37°C, 220 об./мин. Затем изолированные полиморфноядерные клетки добавляли в соотношении 400 : 1 к смеси бактерии/комплемент (конечный объем 160 мкл на лунку). Планшет помещали на автоматический шейкер на 40 мин при 37°C, 250 об./мин. На следующем этапе раствор в каждой лунке разбавляли одинаковым объемом (160 мкл) 0.9%-ного NaCl. Через 5 мин по 10 мкл образцов из каждой лунки отбирали и наносили на поверхность агаризованной среды 2YT ("Sigma-Aldrich", США) в чашки Петри, которые затем помещали в термостат при 37°C на 5 сут. Через 5 сут подсчитывали количество КОЕ.

Статистика. Результаты количественных тестов обрабатывали стандартными процедурами, интегрированными в программное обеспечение Excel 2007 ("Microsoft", США). Статистическую обработку полученных результатов проводили по стандартным методикам с использованием *t*-критерия Стьюдента для оценки достоверности различий между выборками в опытных и контрольных экспериментах. По результатам вычисления среднеарифметического и стандартного отклонения для данной выборки с объемом *n* (число измерений) определяли стандартную ошибку среднеарифметического и границы его доверительного интервала с учетом коэффициента Стьюдента *t* при уровне значимости 95% ($p = 0.05$) и $n = 6$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

После завершения иммунизации оценку пролиферативной активности лимфоцитов и макрофагов проводили по способности клеток восстанавливать соли тетразолия до формазана (WST-8–тест). WST-8 — водорастворимая соль тетразолия (2-(2-methoxy-4-nitrophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulphophenyl)-2H-tetrazolium, sodium salt), которая используется в колориметрическом тесте для оценки метаболической активности клеток, клеточной пролиферации и анализа цитотоксичности. Принцип обнаружения заключается в том, что WST-8 восстанавливается внутриклеточной дегидрогеназой до водорастворимого соединения формазана оранжево-желтого цвета. Количество формазана пропорционально количеству жизнеспособных клеток — чем больше жизнеспособных пролиферирующих клеток, тем интенсивнее окраска.

На рис. 1 представлены результаты определения пролиферативной активности перитонеальных макрофагов и спленоцитов, выделенных у животных разных групп после иммунизации. Отметим, что введение животным нативного бруцеллина приводило к угнетению пролиферации лимфоидных клеток. Конъюгация Аг с НЧЗ снимала отрица-

тельный эффект влияния Аг на фагоцитирующие клетки — пролиферативная активность увеличивалась в 4–5 раз и оставалась на уровне контроля или введения раствора неконъюгированных НЧЗ.

Сходные результаты были получены при поствакцинальном инъецировании животным клеток штамма *B. abortus* 82 — пролиферативная активность лимфоидных клеток увеличивалась в 7 раз по сравнению с введением нативного Аг и оставалась на уровне контроля или использования раствора неконъюгированных НЧЗ (рис. 2).

Вакцинные штаммы должны вызывать стимулирование метаболической активности как фаго-

цитирующих клеток, так и спленоцитов. Однако в группе, иммунизированной нативным Аг, этой стимуляции мы не наблюдали. Данный эффект, вероятно, связан с угнетением фагоцитирующего (клеточного) звена иммунитета бруцеллином. НЧЗ снижали этот эффект.

Титр, полученных после иммунизации бруцеллином Аг в сыворотке крови, определяли с помощью твердофазного ИФА. Результаты представлены в табл. 1. В табл. 2 показаны результаты определения титров Аг в сыворотках мышей после инъецирования животным клеток штамма *B. abortus* 82.

Таблица 1. Титры антисывороток, полученных при вакцинации мышей бруцеллином по различным схемам

Иммуноген	Титр		
	Средний титр	Максимальный титр	Средний титр, $\log_2$
Аг + НЧЗ	1 : 1920	1 : 2560	10.82
Аг	1 : 426	1 : 640	8.66
НЧЗ	0	0	0
К (ФСБ)	0	0	0

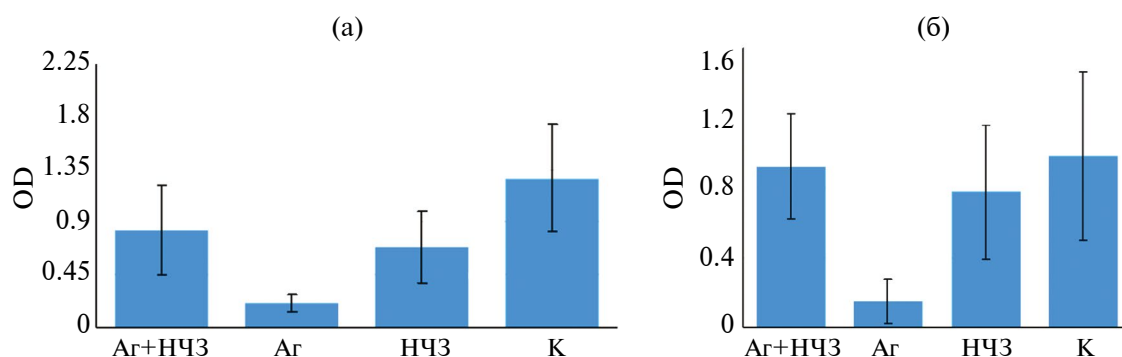


Рис. 1. Определение пролиферативной активности перитонеальных макрофагов (а) и спленоцитов (б) при иммунизации животных бруцеллином по различным схемам (OD — концентрация формазана в расчет на одну клетку, нг; К — контроль, ФСБ).

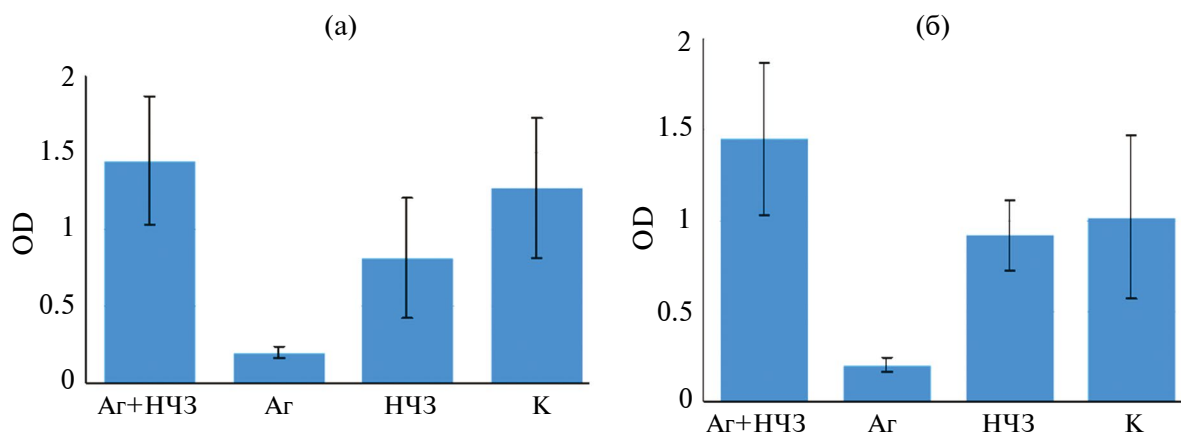
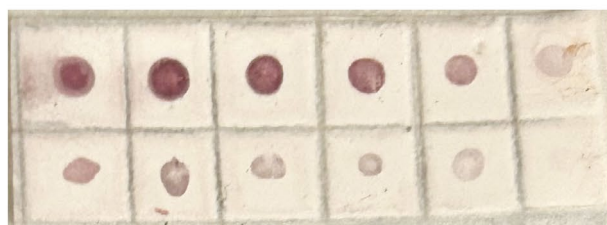


Рис. 2. Определение пролиферативной активности перитонеальных макрофагов (а) и спленоцитов (б) при иммунизации животных бруцеллином после инъецирования животным клеток штамма *B. abortus* 82.

Таблица 2. Титры антисывороток, полученных при вакцинации мышей бруцеллином, по различным схемам после инъектирования животным клеток штамма *B. abortus* 82

Иммуноген	Титр		
	средний титр	максимальный титр	средний титр, $\log_2$
Аг + НЧЗ	1 : 5973	1 : 10240	12.4
Аг	1 : 320	1 : 320	8.3
НЧЗ	0	0	0
К (ФСБ)	0	0	0

(а)



(б)



(в)



(г)

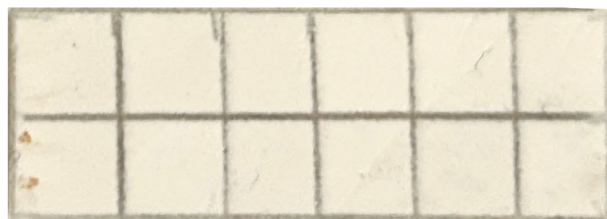


Рис. 3. Дот-иммуноанализ бруцеллина с использованием антисывороток, полученных при иммунизации животных Аг + НЧЗ (а), Аг (б), НЧЗ (в), ФСБ (г); мечение — конъюгат НЧЗ со стафилококковым белком А.

Таким образом, введение вакцинного штамма *B. abortus* 82 вызывало стимуляцию выработки Ат — максимальный титр при введении конъюгата Аг+НЧЗ составил 1 : 10240. В отношении группы, которой вводили нативный Аг, наблюдали угнетение выработки Ат (титр составил 1 : 320), то есть наблюдалось угнетение также антителообразующего (гуморального) звена иммунитета. И снова НЧЗ ослабляли этот эффект.

Результаты ИФА были подтверждены методом дот-иммуноанализа (рис. 3). Антисыворотка, полученная при иммунизации животных Аг + НЧЗ, оказалась наиболее чувствительной. Предел обнаружения составил ~1 нг.

Для оценки активности фагоцитоза сывороток, полученных от контрольной и экспериментальных групп животных, вакцинированных бруцеллином, была использована опсонофагоцитарная реакция. Анализ опсонофагоцитарного уничтожения используется для измерения функциональной способности Ат. Его результаты коррелируют с защитными свойствами вакцин-кандидатов [38, 39]. Опсонофагоцитарная активность является основным показателем функциональной активности антител *in vitro* и зависит от связывания антител и фиксации комплемента, что ведет к гибели бактерий и клиренсу. Значительное уничтожение обычно определяется как снижение бактериальных КОЕ более чем на 40% [40]. Для достоверности анализов среднее количество КОЕ в контрольных лунках без сыворотки должно быть не менее 250. Опсонофагоцитарная реакция — легко воспроизводимый анализ с доступными стандартными реагентами, который является ценным инструментом для оценки Ат, специфичных для патогенов, в исследованиях естественного иммунитета и вакцин. Измерение функциональности опсонических антител является важным компонентом клинического пути разработки эффективных вакцин. [41, 42].

На рис. 4а представлены результаты опсонофагоцитарной реакции после иммунизации мышей бруцеллином. Необходимо отметить, что в группе

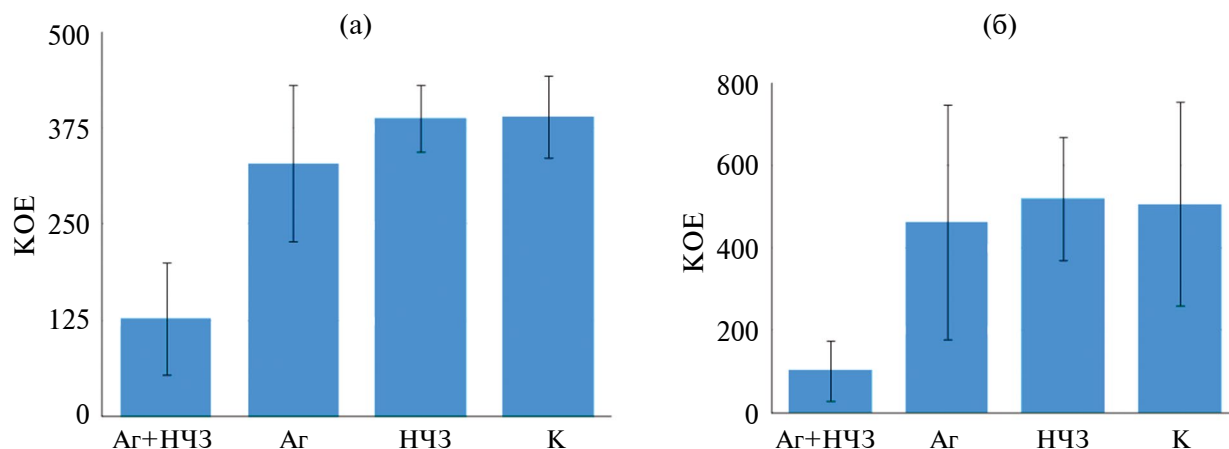


Рис. 4. Количество КОЕ, выявленных в результате опсонофагоцитарной реакции сывороток мышей после иммунизации бруцеллином (а) и последующего после инъектирования животным клеток штамма *B. abortus* 82 (б).

животных, иммунизированных $Ag + HЧЗ$, обнаружена более интенсивная выработка опсонизирующих Ат, что подтверждалось снижением КОЕ в 3 раза по сравнению с контролем. После инъекции животным клеток штамма *B. abortus* 82 этот эффект стал еще более выраженным — количество КОЕ снизилось в 5 раз по сравнению с контролем (рис. 4б). При этом введение нативного Ag в обоих случаях не приводило к значительному снижению КОЕ, то есть опсонизирующие Ат практически не вырабатывались.

Таким образом, впервые продемонстрировано, что конъюгат бруцеллина с $HЧЗ$ вызывает выраженный иммунный ответ при вакцинации животных. Предложенная схема иммунизации позволяет не только получать Ат для иммунохимических тестов, но и способствовать инактивации персистирующих микроорганизмов.

Развитие иммунотерапии значительно изменило современную медицинскую практику, а $HЧЗ$ стали новаторской платформой для инноваций в области вакцин. $HЧЗ$, характеризующиеся исключительными физико-химическими свойствами, такими как биосовместимость, высокое отношение поверхности к объему, регулируемый размер и функционализация поверхности, обладают замечательным потенциалом для оптимизации доставки Ag , сохранения стабильности вакцин и усиления иммунных реакций [43–45]. Благодаря своим характеристикам $HЧЗ$ могут показывать оптимальную эффективность, как в качестве средств доставки, так и в качестве адъювантов.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена в рамках государственного задания Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (№ Гос. регистрации НИОКТР 124020100145-2).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Эксперименты с лабораторными животными проводили на базе вивария Вавиловского университета (г. Саратов). Разрешительным документом является устав, утвержденный приказом Минсельхоза России от 18 июня 2015 г. № 66-у. Уход, содержание и обращение с животными осуществляли в соответствии с требованиями Руководства по содержанию и использованию лабораторных животных Минздрава РФ, Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых в экспериментальных и других научных целях, и законодательством Российской Федерации.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бухарин О.В. // Вестник Московского университета. Сер. 16. Биология. 2008. № 1. С. 6–13.
2. Евдокимова Н.В., Черенькая Т.В. // Клин. микробиол. антимикроб. химиотер. 2013. Т. 15. № 3. С. 192–197.
3. Bigger J.W. // Lancet. 1944. V. 244. P. 497–500. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(00\)74210-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(00)74210-3)
4. Moyed H.S., Broderick S.H. // J. Bacteriol. 1986. V. 166. P. 399–403. <https://doi.org/10.1128/jb.166.2.399-403.1986>
5. Costerton J.W., Stewart P.S., Greenberg E.P. // Science. 1999. V. 284. P. 1318–1322. <https://doi.org/10.1126/science.284.5418.1318>
6. Бойченко М.Н., Кравцова Е.О., Буданова Е.В. Белая О.Ф., Малолетнева Н.В., Умбетова К.Т. //

- Эпидемиология и инфекционные болезни. 2020. Т. 25. № 1. С. 35–40.
<https://doi.org/10.17816/EID35180>
7. Бойченко М.Н., Кравцова Е.О., Зверев В.В. // Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. 2019. № 5. С. 61–72.
<https://doi.org/10.36233/0372-9311-2019-5-61-72>
 8. Pappas G., Akritidis N., Bosilkovski M., Tsianos E. // N. Engl. J. Med. 2005. V. 352. P. 2325–2336.
<https://doi.org/10.1056/NEJMra050570>
 9. Atluri V.L., Xavier M.N., de Jong M.F., den Hartigh A.B., Tsois R.M. // Annu. Rev. Microbiol. 2011. V. 65. P. 523–541.
<https://doi.org/10.1146/annurev-micro-090110-102905>
 10. Al Dahouk S., Nöckler K. // Expert Rev. Anti-Infect. Ther. 2011. V. 9. P. 833–845.
<https://doi.org/10.1586/eri.11.55>
 11. Hans R., Yadav P.K., Zaman M.B., Poolla R., Thavaselvam D. // Front. Nanotechnol. 2023. V. 5. 1132783.
<https://doi.org/10.3389/fnano.2023.1132783>
 12. Galińska E.M., Zagórski J. // Ann. Agric. Environ. Med. 2013. V. 20. P. 233–238.
 13. Староверов С.А., Дыкман Л.А. // Российские нанотехнологии. 2013. Т. 8. № 11–12. С. 118–122.
<https://doi.org/10.1134/S1995078013060165>
 14. Ko J., Splitter G.A. // Clin. Microbiol. Rev. 2003. V. 16. P. 65–78.
<https://doi.org/10.1128/cmr.16.1.65-78.2003>
 15. Ficht T.A., Kahl-McDonagh M.M., Arenas-Gamboa A.M., Rice-Ficht A.C. // Vaccine. 2009. V. 27. Suppl. 4. P. D40–D43.
<https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2009.08.058>
 16. Avila-Calderon E.D., Lopez-Merino A., Sriranganathan N., Boyle S.M., Contreras-Rodriguez A. // Biomed. Res. Int. 2013. V. 2013. 743509.
<https://doi.org/10.1155/2013/743509>
 17. Wang Z., Wu Q. // Curr. Pharm. Biotechnol. 2013. V. 14. P. 887–896.
<https://doi.org/10.2174/1389201014666131226123016>
 18. Abkar M., Lotfi A.S., Amani J., Eskandari K., Ramandi M.F., Salimian J. et al. // Vet. Res. Commun. 2015. V. 39. P. 217–228.
<https://doi.org/10.1007/s11259-015-9645-2>
 19. Lopes Chaves L., Dourado D., Prunache I.-B., Manuelle Marques da Silva P., Tacyana dos Santos Lucena G., Cardoso de Souza Z. et al. // Int. J. Pharm. 2024. V. 659. 124162.
<https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2024.124162>
 20. Zhuo Y., Zeng H., Su C., Lv Q., Cheng T., Lei L. // J. Nanobiotechnology. 2024. V. 22. 480.
<https://doi.org/10.1186/s12951-024-02758-0>
 21. Liang J., Yao L., Liu Z., Chen Y., Lin Y., Tian T. // Small. 2025. V. 21. № 1. 2407649.
<https://doi.org/10.1002/smll.202407649>
 22. Goetz M., Thotathil N., Zhao Z., Mitrageotri S. // Bioeng. Transl. Med. 2024. V. 9. № 4. e10663.
<https://doi.org/10.1002/btm2.10663>
 23. Fries C.N., Curvino E.J., Chen J.-L., Permar S.R., Fouda G.G., Collier J.H. // Nat. Nanotechnol. 2021. V. 16. № 4. P. 1–14.
<https://doi.org/10.1038/s41565-020-0739-9>
 24. Rajaiah P. // Discov. Med. 2024. V. 1. 58.
<https://doi.org/10.1007/s44337-024-00080-0>
 25. Badten A.J., Torres A.G. // Vaccines. 2024. V. 12. 313.
<https://doi.org/10.3390/vaccines12030313>
 26. Dykman L.A. // Expert Rev. Vaccines. 2020. V. 19. P. 465–477.
<https://doi.org/10.1080/14760584.2020.1758070>
 27. Sengupta A., Azharuddin M., Al-Otaibi N., Hinkula J. // Vaccines. 2022. V. 10. 505.
<https://doi.org/10.3390/vaccines10040505>
 28. Miauton A., Audran R., Besson J., Hajjami H.-M.-E., Karlen M., Warpelin- Decrausaz L. et al. // eBioMedicine. 2024. V. 99. 104922.
<https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2023.104922>
 29. Загоскина Т.Ю., Марков Е.Ю., Калиновский А.И., Голубинский Е.П. // Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. 2001. № 3. С. 65–69.
 30. Staroverov S.A., Vyrshchikov R.D., Bogatyrev V.A., Dykman L.A. // Int. Immunopharmacol. 2024. V. 133. 112121.
<https://doi.org/10.1016/j.intimp.2024.112121>
 31. Frens G. // Nat. Phys. Sci. 1973. V. 241. P. 20–22.
<https://doi.org/10.1038/physci241020a0>
 32. De Jesus A., Pusec C.M., Nguyen T., Keyhani-Nejad F., Gao P., Weinberg S.E., Ardehali H. // STAR Protoc. 2022. V. 3. 101668.
<https://doi.org/10.1016/j.xpro.2022.101668>
 33. Silver A.C. // J. Vis. Exp. 2018. V. 137. e58022.
<https://doi.org/10.3791/58022-v>
 34. Berridge M.V., Herst P.M., Tan A.S. // Biotechnol. Annu. Rev. 2005. V. 11. P. 127–152.
[https://doi.org/10.1016/S1387-2656\(05\)11004-7](https://doi.org/10.1016/S1387-2656(05)11004-7)
 35. Shah K., Maghsoudlou P. // Br. J. Hosp. Med. 2016. V. 77. P. C98–C101.
<https://doi.org/10.12968/hmed.2016.77.7.C98>
 36. Дыкман Л.А., Богатырев В.А. // Биохимия. 1997. Т. 62. № 4. С. 411–418.
 37. Hufnagel M., Koch S., Kropec A., Huebner J. // Int. J. Food Microbiol. 2003. V. 88. № 2–3. P. 263–267.
[https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(03\)00189-2](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(03)00189-2)
 38. Hu B.T., Kirch C., Harris S., Hildreth S.W., Madore D.V., Quataert S.A. // Clin. Diagn. Lab. Immunol. 2005. V. 12. № 2. P. 287–295.
<https://doi.org/10.1128/CDLI.12.2.287-295.2005>
 39. Maleki M., Salouti M., Ardestani M.S., Talebzadeh A. // Artif. Cells Nanomed. Biotechnol. 2019. V. 47. P. 4248–4256.
<https://doi.org/10.1080/21691401.2019.1687490>
 40. Dwyer M., Gadjeva M. // Methods Mol. Biol. 2014. V. 1100. P. 373–379.
https://doi.org/10.1007/978-1-62703-724-2_32

41. Salehi S., Hohn C.M., Penfound T.A., Dale J.B. // mSphere. 2018. V. 3. e00617–e00618. <https://doi.org/10.1128/msphere.00617-18>
42. Leung S., Collett C.F., Allen L., Lim S., Maniatis P., Bolcen S.J. et al. // Vaccines. 2023. V. 11. 1703. <https://doi.org/10.3390/vaccines11111703>
43. Kizilbash N., Suhail N., Soliman M., Elmagzoub R.M., Marsh M., Farooq R. // Curr. Pharm. Biotechnol. 2025.
44. Mandal S. // JETIR. 2025. V. 12. P. a959–a974.
45. Teimouri H., Taheri S., Saidabad F.E., Nakazato G., Maghsoud Y., Babaei A. // Biomed. Pharmacother. 2025. V. 183. 117844. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2025.117844>

Effect of Brucellin Conjugated with Gold Nanoparticles on the Immune Response and Phagocytosis of *Brucella*

L. A. Dykman^{a,*}, S. A. Staroverov^a, and R. D. Vyrshchikov^a

^a*Institute of Biochemistry and Physiology of Plants and Microorganisms — Research Institution Saratov Federal Scientific Centre of the Russian Academy of Sciences, Saratov, 410049 Russia*

*e-mail: dykman_l@ibppm.ru

A conjugate of 15-nm gold nanoparticles with brucellin, a polysaccharide-protein complex isolated from the *Brucella* vaccine strain, was obtained. The obtained conjugate was used to vaccinate white mice. The drug was administered intraperitoneally three times with an interval of 7 days. After that, all animals were injected with a suspension of cells of the *Brucella abortus* 82 vaccine strain. Using a cell proliferative test, it was shown that in the group of animals immunized with a brucellin conjugate with gold nanoparticles, phagocytic cells and splenocytes had higher metabolic activity compared to the group immunized with the native antigen. Moreover, this trend was enhanced after the introduction of the vaccine strain. The highest antibody titer was observed in animals immunized with a brucellin conjugate with gold nanoparticles (1 : 2560 initially and 1 : 10240 after stimulation with the vaccine strain). It is important that during the opsonophagocytic reaction, the level of opsonizing antibodies was very high, which helped neutralize bacteria persisting in the animals.

Keywords: gold nanoparticles, brucellin, immunization, antibodies, proliferative activity, opsonophagocytic reaction