

ЛЯЛИНА  
ТАТЬЯНА СЕРГЕЕВНА

**Иммуногенные свойства белковых частиц, капсулированных в  
полисахаридную матрицу**

03.01.06 – Биотехнология  
(в том числе бионанотехнологии)

**АВТОРЕФЕРАТ**  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Работа выполнена в лаборатории инженерии биополимеров Института биоинженерии, Федерального исследовательского центра «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН

и в лаборатории клеточных взаимодействий ФГБУН Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН

Научный руководитель: д.х.н., профессор, Варламов Валерий Петрович  
Научный консультант: к.б.н., Свищевская Елена Викторовна

Официальные оппоненты: **Елена Михайловна Серба,**  
доктор биологических наук, доцент,  
профессор РАН, старший научный  
сотрудник отдела биотехнологии  
ферментов, дрожжей, органических кислот  
и биологически активных добавок, ФГБНУ  
«Всероссийский научно-  
исследовательский институт пищевой  
биотехнологии» (ФГБНУ ВНИИПБТ)

**Евгений Сергеевич Шилов,**  
кандидат биологических наук, научный  
сотрудник, Кафедра иммунологии,  
Биологический факультет, МГУ имени  
М.В. Ломоносова.

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное  
учреждение науки Уфимский Институт биологии Российской академии наук

Защита состоится 25 октября 2016 г. в 15 часов 30 минут на заседании  
диссертационного совета Д.501.001. 21 при Московском государственном  
университете имени М.В. Ломоносова по адресу: 119234, Москва, Ленинские  
горы, дом 1, МГУ, корп.12, Биологический факультет, ауд. М-1.  
Тел.8(495)939-54-83, эл. почта npiskunkova@rambler.ru

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке МГУ и на сайте  
биологического факультета МГУ <http://www.bio.msu.ru/>.  
Автореферат разослан

Ученый секретарь  
диссертационного совета.

Пискункова Нина Федоровна.

## **Характеристика работы**

### **Актуальность проблемы**

Вакцинация – это основной способ профилактики инфекционных заболеваний. Защита от внеклеточных патогенов обеспечивается за счет выработки иммунной системой антител, распознающих поверхностные белки патогенов. Для защиты от внутриклеточных инфекций обязательным является формирование Т-клеточного цитотоксического ответа. Для активации гуморального иммунитета требуется процессинг антигена антиген-представляющими клетками (АПК) через эндосомально-лизосомальный путь, что легко достигается при использовании белковых антигенов в сочетании с адьювантами. Для активации цитотоксических Т-клеток требуется внутриклеточный процессинг антигена через протеасомный путь, для чего необходимо попадание белков антигена в цитозоль АПК. Задача доставки антигенов в протеасомный путь АПК сейчас решается с помощью использования ослабленных патогенов (живые аттенуированные вакцины), что у людей с ослабленным иммунитетом может вызвать заболевание. В настоящее время используются аттенуированные вирусные вакцины против полиомиелита, кори, паротита, краснухи и ветряной оспы. Субъединичные вакцины характеризуются отсутствием патогенности, низкой реактогенностью и возможностью легкой стандартизации, но не обладают достаточной иммуногенностью.

Поиск безопасных вакцин, обеспечивающих эффективное формирование цитотоксического ответа и не представляющих опасности перенесения заболевания, является актуальной медико-биологической задачей.

Одним из возможных шагов в направлении повышения эффективности вакцинации является разработка вакцин на основе нано- и микрочастиц (так называемые «партикулярные вакцины»), о чем свидетельствуют результаты многочисленных исследований (Zhao et al., 2014).

Партикулярные вакцины могут сочетать в себе иммуномодулирующие свойства, свойства целевой доставки антигена и работать как адьювант (De Temmerman et al., 2011; Ferreira, Gama, & Vilanova, 2013). Крупный размер таких систем способствует их проникновению в клетку путем фагоцитоза, что является преимуществом, так как фагосомам отводится ведущая роль в процессе кросс-презентации.

В качестве таких композиций широко применяются липосомы (Badiee et al., 2012; Wang, Wang, Zhang, Chen, & Deng, 2014); наночастицы на основе PGA, PLGA, PLA (Moon et al., 2012; Waeckerle-Men et al., 2006); а также частицы на основе хитозана и его производных (Amidi et al., 2007; Slütter et al.,

2010).

*Хитозан и его производные* являются перспективным материалом для разработки нано- и микроразмерных систем для доставки антигенов и лекарств. Часто такие частицы используются для мукозальной иммунизации пероральным или интраназальным путем, что связано с мукоадгезивными свойствами хитозана. Благодаря этому, частицы на основе хитозана и его производных увеличивают продолжительность пребывания антигена на слизистых оболочках и их поглощение (Amidi et al., 2007; Moon et al., 2012).

**Цель работы:** разработать системы доставки белковых антигенов на основе природных полисахаридов и охарактеризовать тип иммунного ответа на капсулированный антиген.

**Задачи исследования:**

1. Оптимизация методики получения наночастиц термической обработкой белка и их характеристика;
2. Модификация белковых наночастиц природными полисахаридами: хитозаном, N-сукцинилхитозаном и галактоманнаном и их характеристика;
3. Анализ взаимодействия полученных наночастиц с эпителиальными и макрофагальными клетками *in vitro*;
4. Индукция гуморального иммунного ответа полученными наночастицами *in vivo* в мышинной модели;
5. Анализ клеточного иммунного ответа на наночастицы методом *ex vivo*.

**Научная новизна**

В данной работе впервые проведен сравнительный анализ эффективности индукции гуморального и цитотоксического Т-клеточного ответа с помощью панели наночастиц (НЧ), полученных на основе лактоферрина, покрытого полисахаридными оболочками (хитозан, N-сукцинилхитозан, галактоманнан). Впервые проведено исследование роли заряда, наличия гидрофобных заместителей, наличия агониста маннозного рецептора галактоманнана в составе наночастиц на их способность активировать иммунную систему. В экспериментах *in vitro* на линии макрофагальных клеток впервые было показано различие во внутриклеточном транспорте частиц, вызывающих и не вызывающих клеточный цитотоксический ответ. Впервые показано, что введение гидрофобных заместителей значительно снижает иммуногенность конструкции.

**Практическая значимость**

Результаты, полученные в рамках диссертационной работы, показывают перспективность использования полисахаридной оболочки определенного

состава для индукции различного типа иммунного ответа. Разработанные конструкции имеют низкую токсичность, при их формировании не используются токсичные сшивающие агенты; они также характеризуются высоким выходом и эффективностью упаковки антигена, что обеспечивает экономическую эффективность данного процесса и возможность применения таких конструкций в медицинских целях.

В процессе работы был получен патент Российской Федерации №2510849 от 30 октября 2012 года «Способ обработки молочной сыворотки» авторов Бакулина А.В., Лопатина С.А., Щербининой Т.С., Варламова В.П., Курченко В.П., Агарковой Е.Ю., Харитоновой В.Д., Ботиной С.Г. (Зарегистрирован в Государственном реестре изобретений Российской Федерации 05 февраля 2014 года).

### **Связь работы с научными программами**

Работа выполнена при финансовой поддержке государственного контракта № 12.527.11.008, грантов РФФИ (проекты №№ 14-04-00687 а, 12-04-97039-р\_поволжье\_a, 12-08-01044-а)

### **Апробация работы и публикации**

Результаты работы были представлены автором в виде устных докладов на конференциях: международный научно-практический симпозиум «Перспективные ферментные препараты и биотехнологические процессы в технологиях продуктов питания и кормов» (Москва, 2012), 12-я Международная конференция “Современные перспективы в исследовании хитина и хитозана” РосХит 2014 (Пермь, 2014), 22<sup>nd</sup> Annual International Conference on Composites or Nano Engineering (ICCE-22) (Saint Julien, Malta, 2014). Материалы диссертации были представлены и обсуждены на конференциях: 11-я Международная конференция “Современные перспективы в исследовании хитина и хитозана” РосХит-2012 (Мурманск, 2012), VI Российский симпозиум «Белки и пептиды» (Уфа, 2013), XXVI зимняя молодежная научная школа "Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии" (Москва, 2014), Международная конференция по биоорганической химии, биотехнологии и бионанотехнологии, посвященная 55-летию Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук и 80-летию со дня рождения академика Ю.А. Овчинникова (Москва, 2014 года), 13<sup>th</sup> EAACI Immunology Winter School “Basic Immunology Research In Allergy and Clinical Immunology” (Les Arcs 1800, France, 2015), XXVII Зимняя Молодежная Научная Школа «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии»

(Москва, 2015 г). XXVIII Зимняя Молодежная Научная Школа «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии» (Москва, 2016 г).

По теме диссертации опубликовано 17 научных работ, среди них 5 статей в журналах, рекомендованных ВАК, 2 в иностранных рецензируемых журналах, 9 тезисов докладов. Получен 1 патент РФ.

**Личный вклад автора** заключается в планировании и проведении экспериментальных и теоретических исследований, а также в их анализе и подготовке к печати полученных результатов. Основные результаты работы получены автором лично при его непосредственном участии в планировании и проведении экспериментов.

### **Структура и объем диссертации**

Диссертация состоит из следующих разделов: «Введение», «Обзор литературы», «Материалы и методы исследования», «Результаты и их обсуждение», «Выводы», «Список цитируемой литературы». Работа изложена на 134 страницах, содержит 37 рисунков и 7 таблиц. Список литературы содержит 153 ссылки на источники.

## **СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ**

### **1. Выделение лактоферрина**

В качестве модельного антигена из панели глобулярных белков (лактоферрин, лактоглобулин, овальбумин, бычий альбумин) был выбран белок молочной сыворотки лактоферрин из-за его способности формировать стабильные наночастицы при термической обработке. Лактоферрин (ЛФ) выделяли методом ионообменной хроматографии в одну стадию с чистотой более 95%; продукт был охарактеризован методами высокоэффективной жидкостной хроматографии, гель-электрофореза и двойной радиальной иммунодиффузии.

### **2. Исследование биологической активности лактоферрина**

С целью исследования сохранения функциональной активности выделенного белка анализировали специфические биологические свойства ЛФ, а также влияние степени насыщения ЛФ железом. Показали, что апо-форма белка обладает рибонуклеазной активностью, антимикробными свойствами в отношении бактерий и дрожжей, а также способностью ингибировать перекисное окисления липидов.

### **3. Синтез производных хитозана**

Для разработки полимерного носителя ЛФ использовали производные хитозана, различающиеся по заряду и гидрофобности, а также вводили лиганд маннозного рецептора – галактоманнан. В качестве исходного сырья для

получения производных использовали низкомолекулярный хитозан с ММ 50 кДа, полученный путем кислотного гидролиза высокомолекулярного хитозана. N-сукцинилхитозан (СХ), N-сукцинил-N-[2-(3)-(додец-2'-ен-1'-ил)сукцинил]хитозан (СДХ) и N-гексаноилхитозан получали с помощью ангидридов карбоновых кислот. Синтез осуществляли в гомогенных условиях с выходом не менее 80%. Степени замещения полученных производных определяли методом <sup>1</sup>H-ЯМР-спектроскопии. Характеристики синтезированных производных хитозана приведены в таблице 1.

Таблица 1. Физико-химические параметры производных хитозана, использованных в работе.

	ММ, кДа	СД, %	СЗ, %	ζ-потенциал, мВ
Хитозан (Х)	20	90	-	25±5
N-сукцинилхитозан (СХ340)	340	90	60	-27±5
N-сукцинилхитозан (СХ50)	50	90	70	-24±5
N-сукцинилдодецинилхитозан (СДХ)	50	90	70/9*	-22±5
N-гексаноилхитозан (ГХ)	200	87	10	35±5

\*СЗ сукцинильными/додеценилсукцинильными группами.

Введение отрицательно заряженных заместителей в молекулу хитозана (сукцинил-) позволило увеличить растворимость хитозана при нейтральных рН, а также придать молекуле хитозана суммарный отрицательный заряд, что требовалось для формирования полиэлектролитного комплекса (ПЭК) с положительно заряженным белком – лактоферрином.

Гидрофобно-модифицированное отрицательно заряженное производное N-2-(3)-(додец-2'-ен-1'-ил)сукцинилхитозан использовали для придания наночастицам гидрофобных свойств.

#### 4. Оптимизация получения лактоферрин-содержащих частиц

Частицы на основе ЛФ и производных хитозана проводили методом контролируемой термической обработки, состоящего из этапа формирования полиэлектролитного комплекса (ПЭК) между отрицательно заряженными СХ или СДХ и положительно заряженным белком с последующей термической обработкой ПЭК. Контрольные частицы ЛФ, не содержащие полисахарид, получали аналогичной термической обработкой.

Для получения стабильных гомогенных частиц исследовали влияние концентрации белка и полимеров, времени термической обработки, введения стабилизирующего агента полиэтиленгликоля. Десорбция ЛФ из частиц при инкубации в фосфатном буфере в течение 72 часов при температуре 37°C была

незначительной, что повышает вероятность проникновения антигена в АПК в капсулированной форме.

Суммарный заряд частиц СХ-ЛФ и СДХ-ЛФ был отрицательным. Для получения положительно заряженных частиц СХ-ЛФ после формирования частиц покрывали положительно заряженным хитозаном с ММ 20 кДа путем суспендирования в растворе хитозана за счет формирования ПЭК. Для специфического связывания с АПК, экспрессирующим маннозный рецептор, частицы формировали в присутствии галактоманнана (СХ-ГМ-ЛФ). Все частицы после формирования очищали от несвязанного белка и полимеров центрифугированием. В ряде случаев для получения гомогенных частиц и повышения выхода вводили полиэтиленгликоль.

В результате проведенных исследований отобрали 5 типов частиц, состав и характеристики которых представлены в таблице 2. Размер частиц определяли методами динамического светорассеяния (ДСР), морфологию определяли методом атомно-силовой микроскопии (АСМ), зета-потенциал частиц определяли методом электрофоретического ДСР.

Таблица 2. - Состав и физико-химические параметры частиц.

	Шифр №	Состав полимерной матрицы	ζ-потенциал, мВ	Размер, нм
1	НЧ-ЛФ	нет	+22±3	120±20
2	СХ-ЛФ	СХ50 ПЭГ	-16 ±5	400±50
3	СХ-ГМ-ЛФ	СХ50 ГМ	-17±5	250±50
4	СХ-ЛФ-Х	СХ50 ПЭГ Х	+19±4	500±50
5	СДХ-ЛФ	СДХ	-15±4	150±50

Частицы ЛФ и СДХ-ЛФ были меньшего размера (120-150 нм), чем остальные 3 типа (250-500 нм). Теоретические модели частиц и репрезентативные АСМ изображения для мелких и крупных частиц представлены на рисунке 1.

В результате были получены частицы, различающиеся по заряду, размеру, гидрофобности и наличию лиганда маннозного рецептора. Все типы частиц обладали высоким по модулю зарядом, что снижает склонность суспензии частиц к агрегации. Получение частиц с положительным и отрицательным зарядом, а также варьирование размера частиц требуется при



исследовании закономерностей их взаимодействия с эукариотическими клетками и внутриклеточного транспорта.

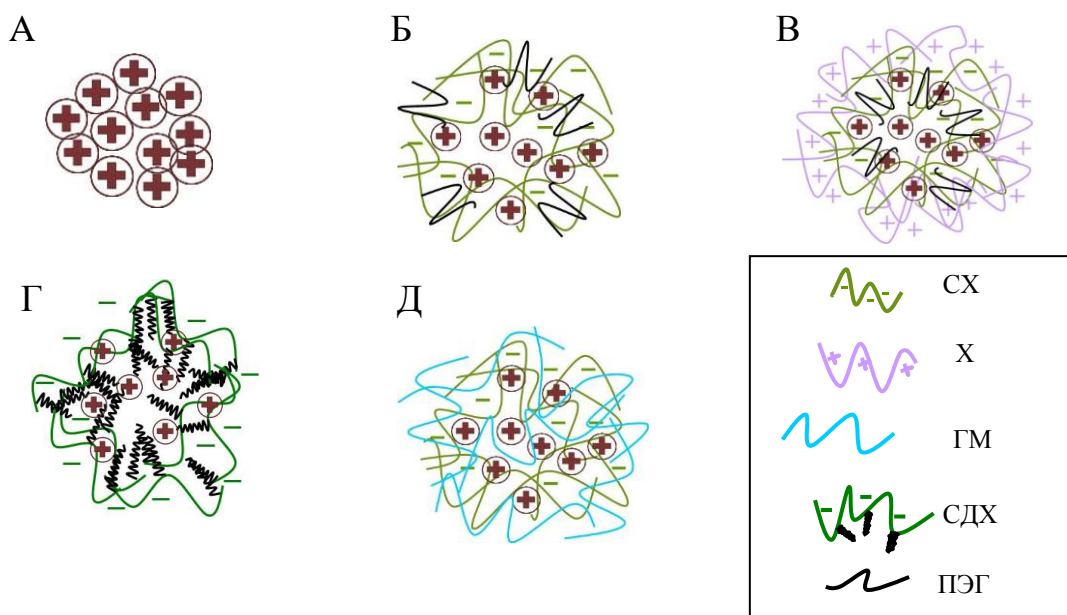


Рисунок 1 - Теоретические модели структуры полученных частиц и их общий вид. А – НЧ-ЛФ; Б – СХ-ЛФ; В – СХ-ЛФ-Х; Г – СДХ-ЛФ; Д – СХ-ГМ-ЛФ.

Расшифровки обозначений приведены в Таблице 2

## 5. Анализ взаимодействия частиц с клетками

Поскольку для индукции иммунного ответа требуется захват антигена АПК, к которым относятся макрофаги и дендритные клетки, то анализ взаимодействия частиц с клетками *in vitro* проводили на клетках макрофагов мыши RAW264.7. В качестве контроля использовали эпителиальные клетки MiaPaCa-2, Colo-357 и другие. Исследования проводили методами проточной цитометрии и конфокальной микроскопии, для чего был получен флуоресцентно меченый белок, а затем наночастицы на его основе.

Пилотные эксперименты показали, что короткой инкубации (2-6 ч) недостаточно для прохождения наночастиц в клетки. Длительные инкубации (24-48 ч) обеспечивали достаточно высокий уровень транспорта частиц внутрь клеток. Однако даже при длительной инкубации некоторая доля частиц не проходила внутрь клеток. В связи с этим, для количественного анализа внутриклеточной фракции хитозана использовали гаситель внеклеточной флуоресценции – трипановый синий (ТС). На рисунке 2 приведены гистограммы интенсивности флуоресценции клеток RAW264.7 и Colo-357 до и после гашения ТС.

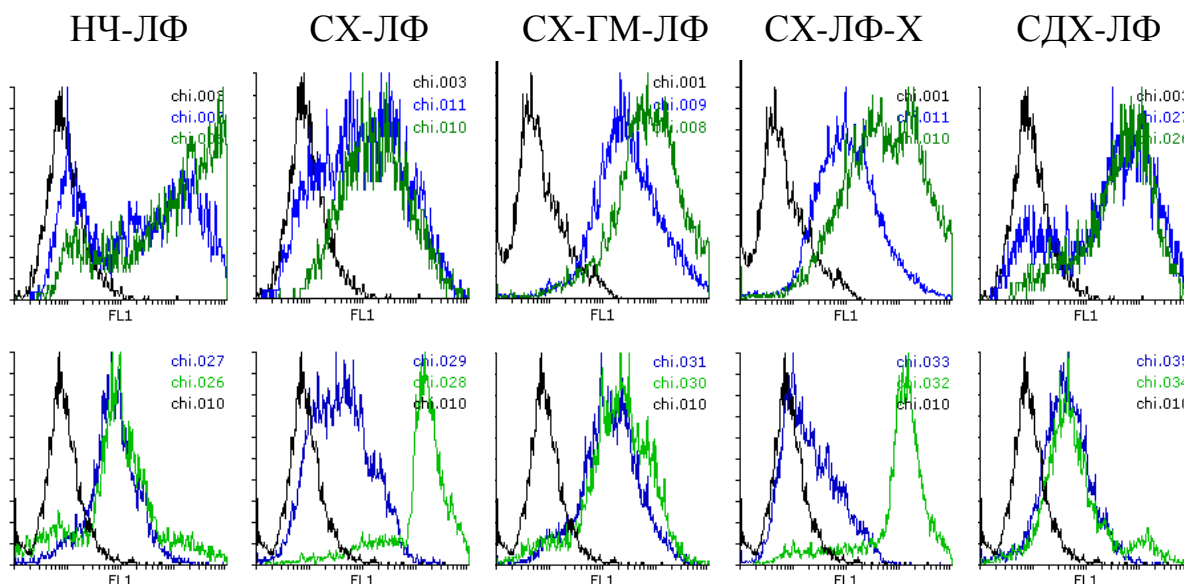


Рисунок 2 – Гистограммы распределения клеток RAW264.7 (верхний ряд) и Colo-357 (нижний ряд) по флуоресценции до инкубации с ФИТЦ-мечеными частицами (черная линия) и после 24 ч инкубации с частицами до (зеленая линия) и после гашения трипановым синим (синяя линия)

Доли клеток, имеющих внутриклеточную локализацию частиц, показаны на рисунке 3. Наиболее эффективно в клетках макрофагов накапливались частицы СХ-ЛФ, СХ-ГМ-ЛФ и СХ-ЛФ-Х. Меньше всего в макрофаги попадало белковых частиц НЧ-ЛФ и гидрофобных частиц СДХ-ЛФ (Рисунок 3А), при этом во всех случаях доля частиц оставалась на мембранах макрофагов. Противоположную картину наблюдали для эпителиальных клеток (коэффициент корреляции  $r=-0.680$ ), которые эффективно захватывали частицы ЛФ и гидрофобные частицы СДХ-ЛФ, но значительно хуже частицы СХ-ЛФ и СХ-ЛФ-Х (Рисунок 3Б).

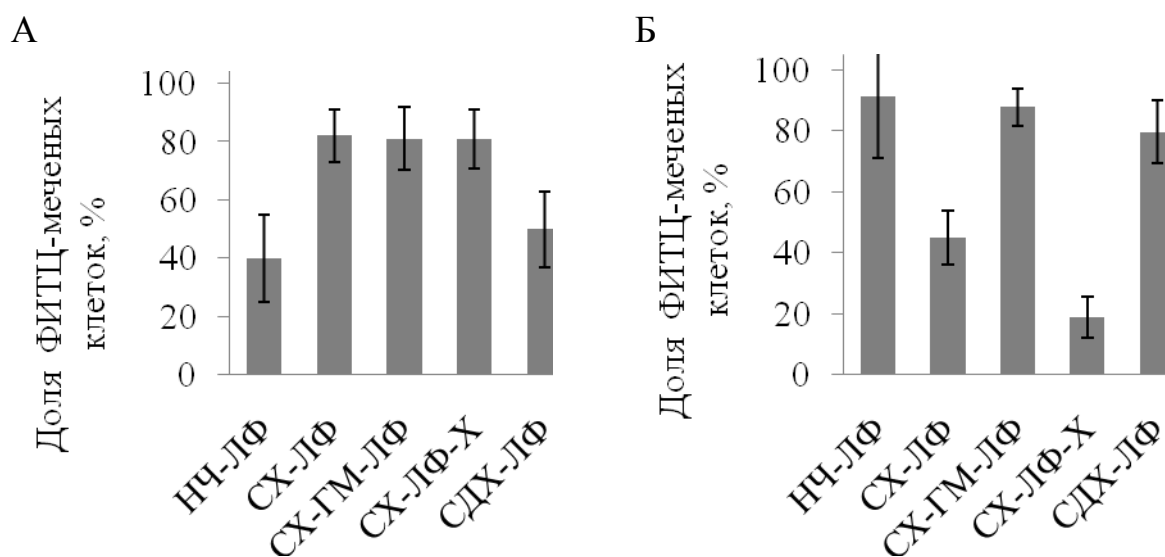


Рисунок 3 – Эффективность проникновения частиц внутрь макрофагальных клеток RAW 264.7 (А) и эпителиальных клеток Colo 357 (Б) (доля клеток, содержащих внутриклеточную фракцию частиц от общего количества ФИТЦ-меченых клеток)

Наличие хитозана, сукцинилхитозана и галактоманнана в составе частиц способствовало контакту частиц с клетками, что приводило увеличению эффективности прохождения частиц в макрофаги. Наличие гидрофобных заместителей в хитозановых частицах снижало эффективность захвата частиц. НЧ-ЛФ в отсутствие хитозана менее эффективно захватывались клетками (Рисунок 3А).

Для эпителиальных клеток решающее значение для прохождения частиц через мембрану имел размер частиц: при гашении внеклеточной флуоресценции практически полностью исчезал сигнал наиболее крупных частиц СХ-ЛФ и СХ-ЛФ-Х (Рисунок 3Б).

### 6. Внутриклеточный транспорт производных хитозана

Для анализа внутриклеточной локализации частиц использовали метод конфокальной микроскопии и панель коммерческих красителей органелл клеток. Пилотные эксперименты были выполнены на растворах полимеров: хитозане, N-сукцинилхитозане и гидрофобном производном – N-гексаноилхитозане. Было показано, что положительно заряженный немодифицированный хитозан быстро связывается с клеточными мембранами, но практически не попадает внутрь клеток даже при длительной инкубации. Отрицательно заряженный N-сукцинилхитозан связывался и проходил внутрь клеток быстро и полностью, а гидрофобный положительно заряженный N-

гексаноилхитозан длительное время удерживался на мембранах клеток (Рисунок 4).

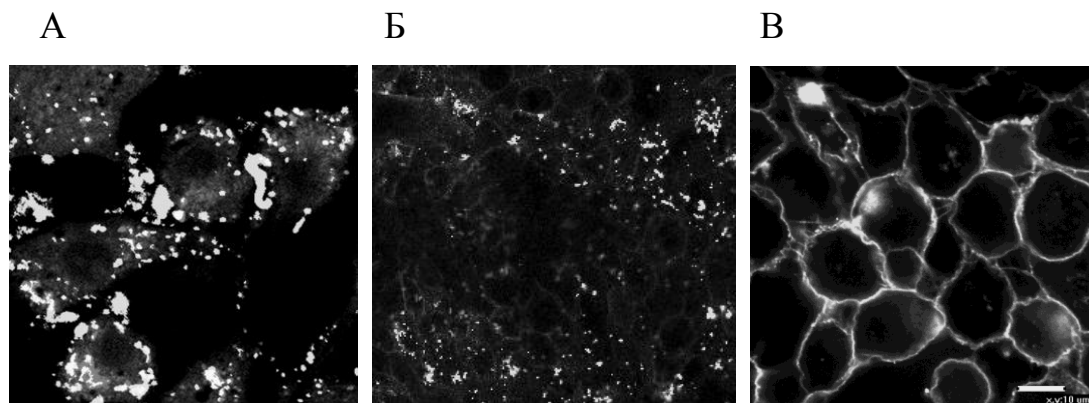


Рисунок 4. – Локализации свободных производных хитозана после 6 ч инкубации. А – хитозан, Б – N-сукцинилхитозан; В – N-гексаноилхитозан.

Анализ внутриклеточной локализации проводили на линии макрофагов только для N-сукцинилхитозана и N-гексаноилхитозана, поскольку немодифицированный хитозан практически не попадал в клетки. Использовали маркеры эндоплазматического ретикулума, митохондрий, аппарата Гольджи, эндосом, лизосом и ядер. Для N-сукцинилхитозана основным местом локализации были лизосомы (Рисунок 5В, Г). N-гексаноилхитозан значительно хуже проходил в клетки, основная его доля наблюдалась на мембранах. Некоторая часть находилась внутри клеток и колокализовалась с митохондриями и лизосомами (Рисунок 5А, Б).

Механизм различного транспорта заряженных производных можно объяснить исходя из концепции внутриклеточной сортировки молекул с разным зарядом. Так, N-гексаноилхитозан имеет максимальный заряд при кислом рН. Повышение рН приводит к потере заряда (Рисунок 6А). И, наоборот, N-сукцинилхитозан имеет максимальный по модулю заряд в щелочной среде и теряет его при снижении рН (Рисунок 6А). На рисунке 6Б приведена схема распределения зон с различным рН внутри эукариотической клетки. Выявленный нами транспорт заряженных производных хитозана соответствует возможной направленности внутриклеточного транспорта заряженных производных хитозана в сторону нейтрализации заряда их молекулы.

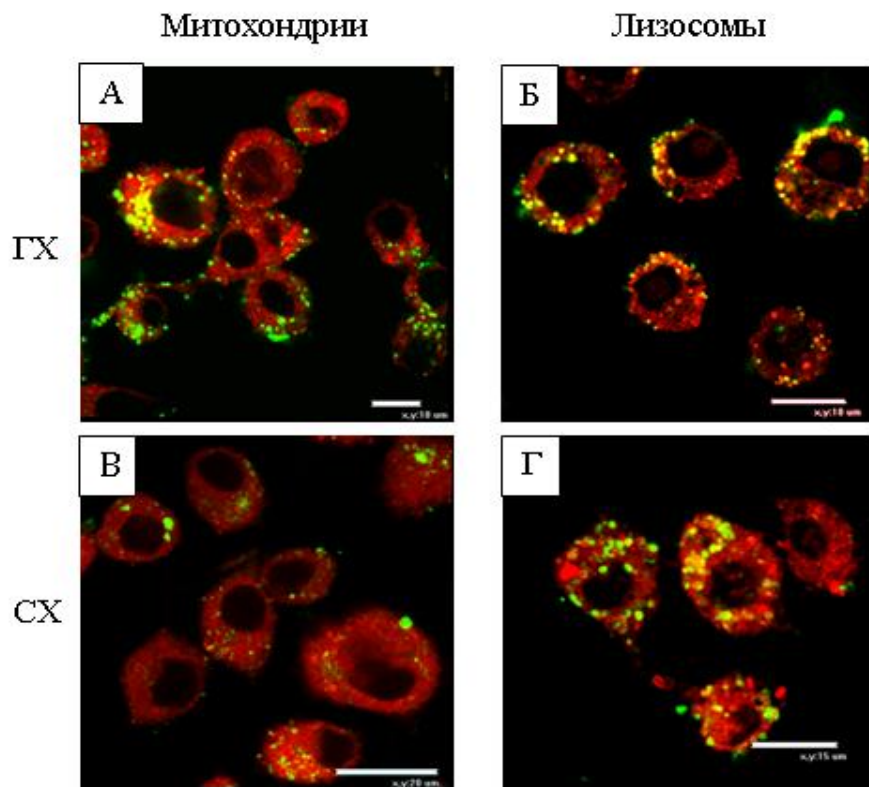


Рисунок 5 - Внутриклеточный трафик производных хитозана в макрофагах при инкубации в течение 12 часов. Клетки линии RAW 264.7 инкубировались с ФИТЦ-мечеными производными хитозана (10 мкг/мл) (зеленый), промывались и затем окрашивались MitoTrackRed (А, В) или LysoTrackRed (Б, Г) в течение 30 минут и исследовались методом конфокальной микроскопии. Шкала соответствует 10–20 мкм

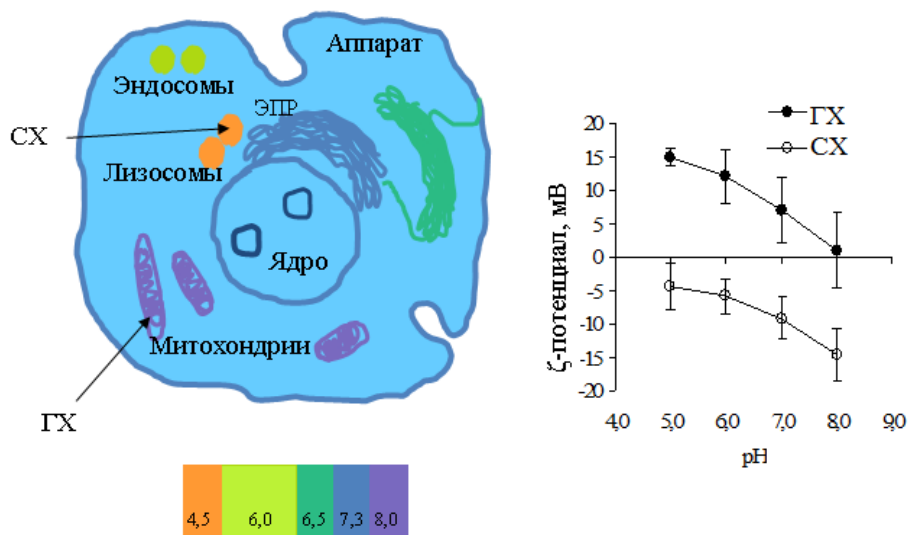


Рисунок 6 - Схема внутриклеточной сортировки разнозаряженных производных. А. Изменение поверхностного потенциала положительно заряженного N-гексаноилхитозана (ГХ) и отрицательно заряженного N-сукцинилхитозана (СХ) при изменении рН буфера. Б. Распределение зон, различающихся по рН, внутри эукариотических клеток показано цветовой шкалой

В то же время, характер митохондриального транспорта ГХ или его фрагментов может определяться и его гидрофобной природой. Таким образом, показано, что внутриклеточный транспорт во многом определяется зарядом молекул полисахарида и его гидрофобными свойствами. Возможно, что и другие свойства такие, как размер частиц, сродство к рецепторам, наличием белков, адсорбированных из окружающей среды, а также специализацией клеток, взаимодействующих с данным полисахаридом/частицей, также могут значительно менять внутриклеточный транспорт.

Полученные результаты позволяют предположить, что использование для разработки модели вакцины производных хитозана с различными свойствами может изменить путь процессинга антигена с везикулярного на протеасомный, что необходимо для формирования клеточного цитотоксического иммунного ответа.

### **6. Внутриклеточный транспорт наночастиц**

Для анализа внутриклеточного транспорта наночастиц использовали аналогичную схему. Клетки выращивали на покровных стеклах, добавляли флуоресцентно меченые частицы (15 мкг/мл), инкубировали 24 часа, на последний час добавляли красители органелл. Внеклеточную флуоресценцию гасили ТС. Основное накопление наночастиц регистрировали в лизосомах и ЭПР. На рисунке 5 приведены конфокальные изображения клеток RAW 264.7 после инкубации с частицами.

Для анализа колокализации использовали программу ImageJ JACoP, определяющую значения коэффициента Пирсона, сравнивающего расположения пикселей разного цвета. Результаты анализа колокализации показали, что частицы СХ-ГМ-ЛФ имели наиболее высокий уровень колокализации с ЭПР ( $p < 0.05$  по сравнению с частицами ЛФ), а для частиц СДХ-ЛФ проявлялась высокая колокализация с лизосомами ( $p < 0.05$  по сравнению с частицами ЛФ) (Рисунок 6).

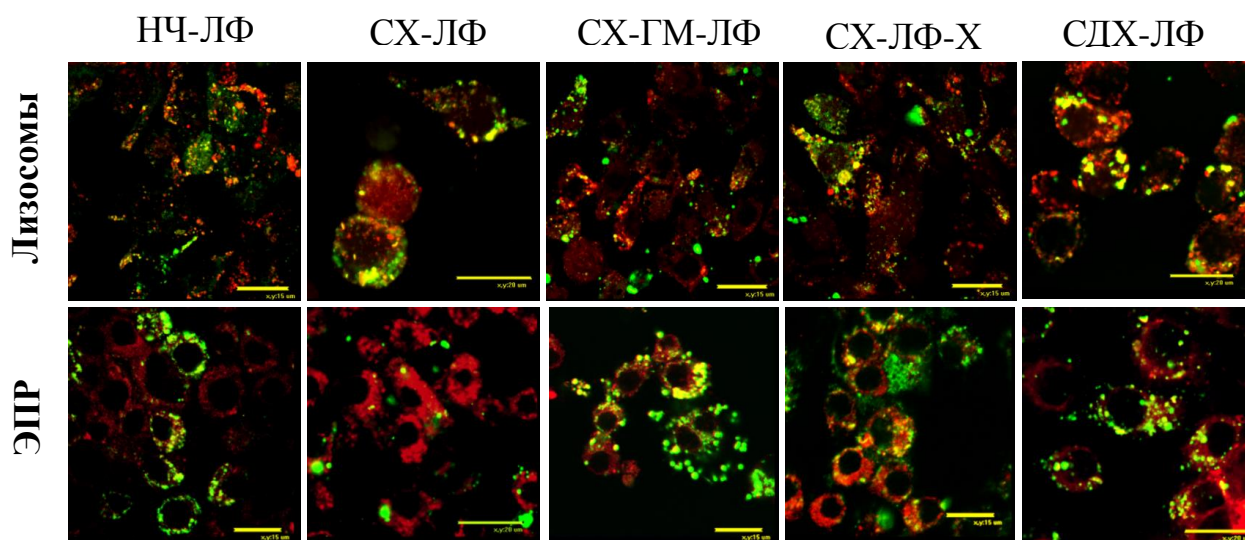


Рисунок 5 – Внутриклеточная локализация наночастиц. Клетки RAW 264.7 инкубировались с 20 мкл суспензии ФИТЦ-меченых наночастиц (зеленый) в течение 24 часов. Клетки окрашены LysoTrackerRed® (трекер лизосом, красный) и ER-Tracker™ Blue-White DPX (трекер ЭПР, красный псевдоцвет)

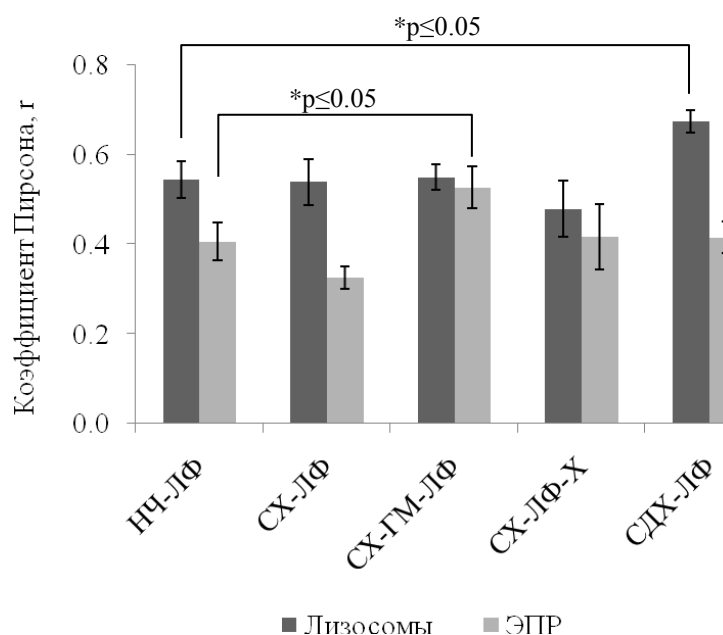


Рисунок 6 – Колокализация частиц с лизосомами и ЭПР. Коэффициенты Пирсона вычислялся путем анализа конфокальных изображений клеток с использованием специализированного программного обеспечения ImageJ. Достоверность отличий определялась с использованием критерия Стьюдента

## 7. Исследование токсичности частиц

Для проведения экспериментов *in vivo* требовалось определить токсичность наночастиц, для чего использовали метод с титразолиевой солью МТТ (Mosmann, 1986). Эксперименты проводили на линиях клеток RAW264.7



и Colo-357 при инкубации в течение 72 часов. Общая токсичность наночастиц при высоких концентрациях составляла 30-40% как для макрофагов, так и для эпителиальных линий (Рисунок 7). Наиболее токсичными для макрофагов были частицы СХ-ГМ-ЛФ и СДХ-ЛФ; для эпителиальных клеток – СХ-ЛФ-Х (Рисунок 7), что подтверждает полученные нами ранее результаты по различному эффекту наночастиц на макрофагальные и эпителиальные клетки.

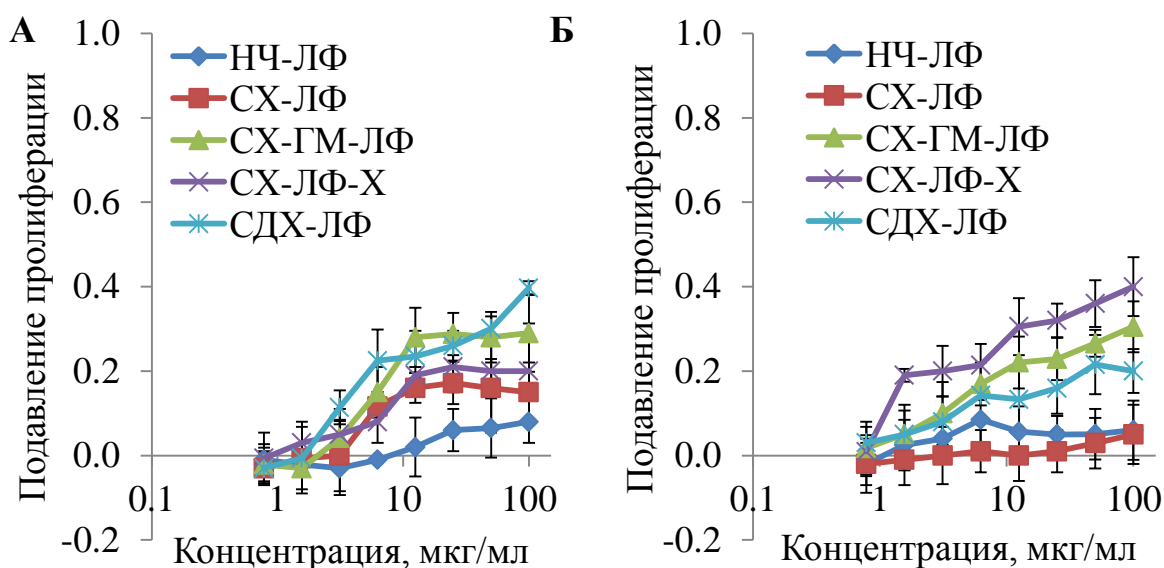


Рисунок 7 – Цитотоксичность частиц в отношении клеток линии RAW 264.7 (А) и Colo 357 (Б), определенная с реактивом МТТ

Поскольку значительных различий по токсичности наночастиц не выявили, то все типы частиц использовали далее для анализа иммуногенности *in vivo*.

#### 8. Схема иммунизации мышей наночастицами и методы анализа типа иммунного ответа

Для анализа иммуногенности лактоферрина в составе наночастиц мышей линии C57BL/6 (n=4-5) иммунизировали 50 мкл суспензии наночастиц без дополнительных адъювантов подкожно в подушечку задней лапы. По лактоферрину иммунизирующая доза составляла 20 мкг. Иммунизацию повторяли трижды с интервалом в 5 дней. Сыворотку крови забирали из орбитального синуса глаза через 2 недели после последней иммунизации. Эксперимент повторяли 3 раза. Формирование и тип гуморального иммунитета оценивали по продукции антител IgG, IgG1 и IgG2a субклассов методом иммуноферментного анализа; на подложку наносили белок лактоферрин. Продукция IgG1 ассоциирована с формированием ответа, опосредованного продукцией интерлейкина-4 и активацией ответа CD4+ Т-клеток 2 типа (Т-хелперы 2 типа, Тх2). Переключение В-клеток на синтез IgG2a требует



продукции интерферона гамма, что ассоциировано с активацией Th1 и последующей активацией цитотоксических CD8+ Т-клеток.

Формирование клеточного ответа оценивали по пролиферации лимфоцитов *ex vivo*, для чего мышам забивали, собирали лимфатические узлы, дренирующие место иммунизации, а также селезенки, из которых выделяли лимфоциты. Клетки окрашивали витальным красителем CFSE, который необратимо связывается с белками цитоплазмы и делится пополам при делении клетки на две дочерние, что позволяет отслеживать пролиферацию клеток.

### 9. Гуморальный иммунный ответ

Анализ IgG антител к лактоферрину показал примерно равные титры во всех группах, кроме группы, иммунизированной гидрофобизованными частицами СДХ-ЛФ (Рисунок 8). Аффинность антител оценивали по наклону дозовой кривой в линейном диапазоне. Аффинность падала в ряду СХ-ГМ-ЛФ>СХ-ЛФ-Х>СХ-ЛФ=ЛФ>>СДХ-ЛФ.

Для исследования поляризации иммунного ответа определяли уровни антител субклассов IgG1 и IgG2a в сыворотке иммунных мышей. За исключением группы СДХ-ЛФ титры IgG1 антител в остальных группах были сравнимы (Рисунок 9). Титры IgG2a различались значительно и падали в ряду СХ-ГМ-ЛФ>СХ-ЛФ-Х>СХ-ЛФ>НЧ-ЛФ (Рисунок 9).

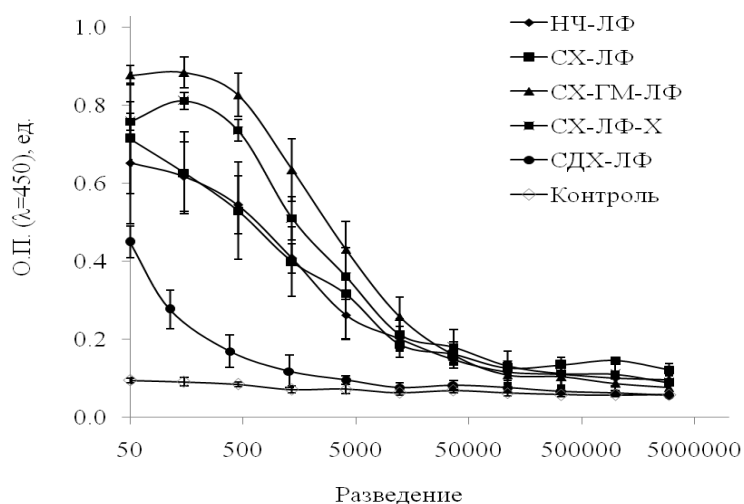


Рисунок 8 – Формирование IgG антител к лактоферрину после иммунизации мышей наночастицами

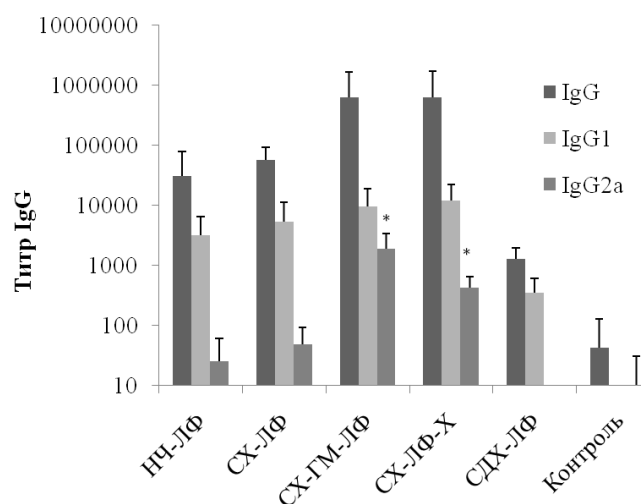


Рисунок 9 – Средние титры IgG, IgG1, IgG2a антител к лактоферрину. Правый столбик соответствует интактной сыворотке. \* Достоверность отличий оценивалась относительно группы, иммунизированной частицами без включения полисахарида (НЧ-ЛФ) по критерию Манна-Уитни,  $p \leq 0.01$

Формирование антител субкласса IgG2a ассоциировано с продукцией ИФН- $\gamma$  и активацией Th1 и цитотоксических лимфоцитов. Таким образом, было показано, что тип гуморального ответа зависит от типа носителя антигена. Использование наночастиц определенного состава может приводить к формированию не только гуморального, но и клеточного иммунного ответа, опосредованного Th1.

#### 10. Характеристика клеточного иммунного ответа

Для анализа общего клеточного ответа получали клетки селезенки и лимфатических узлов от иммунных мышей. Лимфоциты культивировали в присутствии лактоферрина в течение 72 ч и анализировали пролиферацию с использованием реактива CellTiter-Blue. Добавление лактоферрина стимулировало пролиферацию спленоцитов (Рисунок 10). Снижение ответа наблюдали в ряду СХ-ГМ-ЛФ > СХ-ЛФ-Х > СХ-ЛФ > ЛФ, что полностью коррелирует с максимальным титром IgG антител (Рисунок 9).

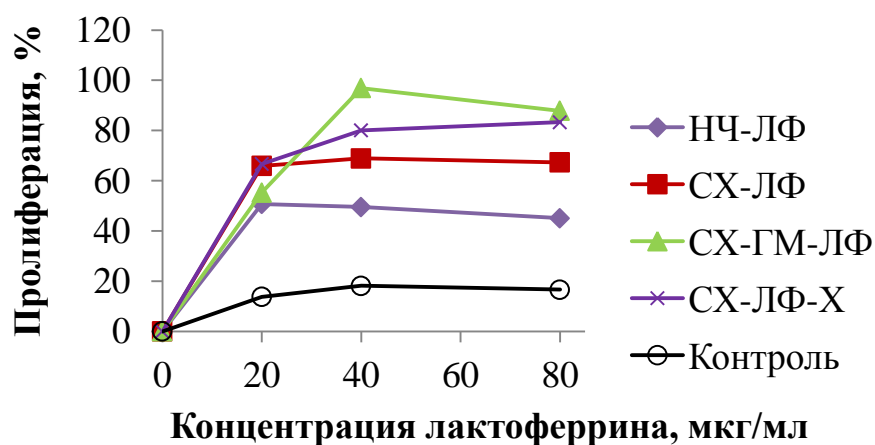


Рисунок 10 – Дозозависимая пролиферация спленоцитов иммунных мышей

Пролиферацию CD8<sup>+</sup> и CD4<sup>+</sup> Т-лимфоцитов оценивали с использованием реактива CFSE, который позволяет визуализировать деление клеток. Репрезентативные графики распределения клеток после окрашивания и 5 дневной пролиферации в присутствии лактоферрина показаны на рисунке 11.

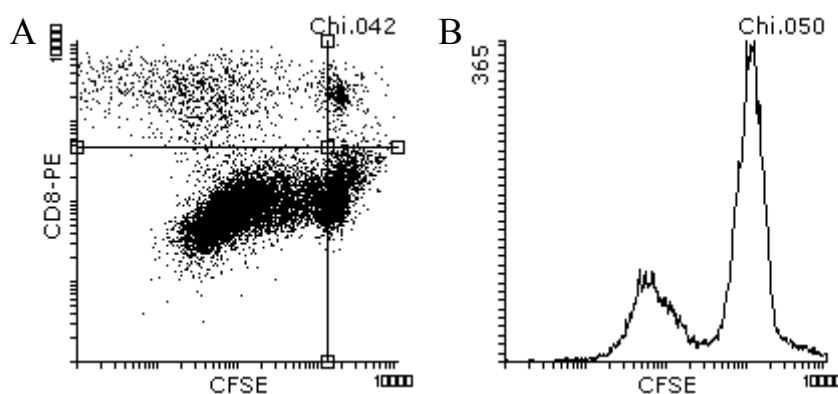


Рисунок 11 – Оценка пролиферации CD8<sup>+</sup> Т-клеток методом проточной цитометрии с окрашиванием клеток витальным красителем CFSE. А. Точечный график распределения делящихся CD8<sup>+</sup> Т-клеток (верхний левый квадрант). Б. Гистограмма, показывающая деление клеток

Результаты исследования пролиферации CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-клеток показаны на рисунке 12.

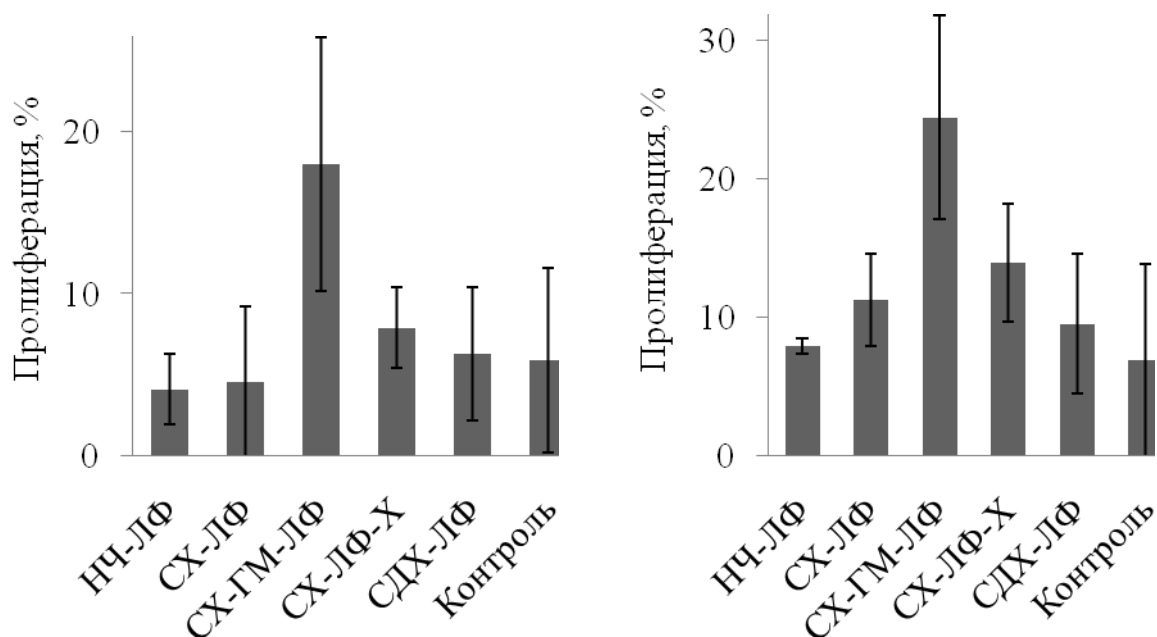


Рисунок 12 – Доля пролиферирующих клеток среди CFSE меченых, положительных по CD4 (А); CFSE меченых, положительных по CD8 (Б) клеток

Эксперименты по анализу пролиферации показали, что появление IgG2a антител в группе с СХ-ГМ-ЛФ коррелирует с усилением активации как CD4+, так и CD8+ Т-клеток. При этом появление IgG2a антител в группе СХ-ЛФ-Х характеризуется усилением активации CD8+, но сравнимой с другими группами активацией CD4+ Т-клеток (Рис.15). Данное различие может быть связано с различным типом кросс-презентации антигена CD8+ Т-клеткам.

Для анализа механизмов кросс-презентации белка в составе СХ-ГМ-ЛФ и СХ-ЛФ-Х провели дополнительные исследования локализации частиц в макрофагах.

### 10. Механизмы кросс-презентации СХ-ГМ-ЛФ и СХ-ЛФ-Х

Ведущими механизмами кросс-презентации – процесса доставки антигена в ЭПР, где пептиды антигена формируют комплексы с молекулами ГКГС I класса, являются цитозольный и вакуольный (Groothuis, 2005). Цитозольный путь предполагает высвобождение антигена из лизосом в цитозоль с последующим протеолизом через протеасомы и доставкой в ЭПР. Вакуольный путь предполагает соединение мембран ЭПР, несущих молекулы ГКГС I класса, с мембранами ранних эндосом, в которых и формируются комплексы. Показано, что галактоманнан препятствует закислению эндосом и способствует слиянию с мембраной ЭПР (Temmerman, 2011; Tizard, 1989, Gagnon, 2002)

Анализ механизмов кросс-презентации лактоферрина в составе полимерных наночастиц СХ-ГМ-ЛФ и СХ-ЛФ-Х также провели методом

конфокальной микроскопии. Показали, что, частицы СХ-ГМ-ЛФ стимулировали формирование эндосом (везикулярные, округлые органеллы, Рисунок 16, зеленая стрелка), окрашенных красителем ЭПР, что соответствует слиянию эндосом с ЭПР и везикулярному типу кросс-презентации. В отличие от СХ-ГМ-ЛФ, частицы СХ-ЛФ-Х, а также частицы ЛФ с большой вероятностью высвобождаются в цитоплазму и процессируются далее через цитозольный путь. ФИТЦ метка регистрируется в виде сетки ЭПР (красные стрелки). Отметим, что частицы СХ-ЛФ-Х и ЛФ заряжены положительно, что меняет их внутриклеточную сортировку, как это было показано выше для гексаноилхитозана.

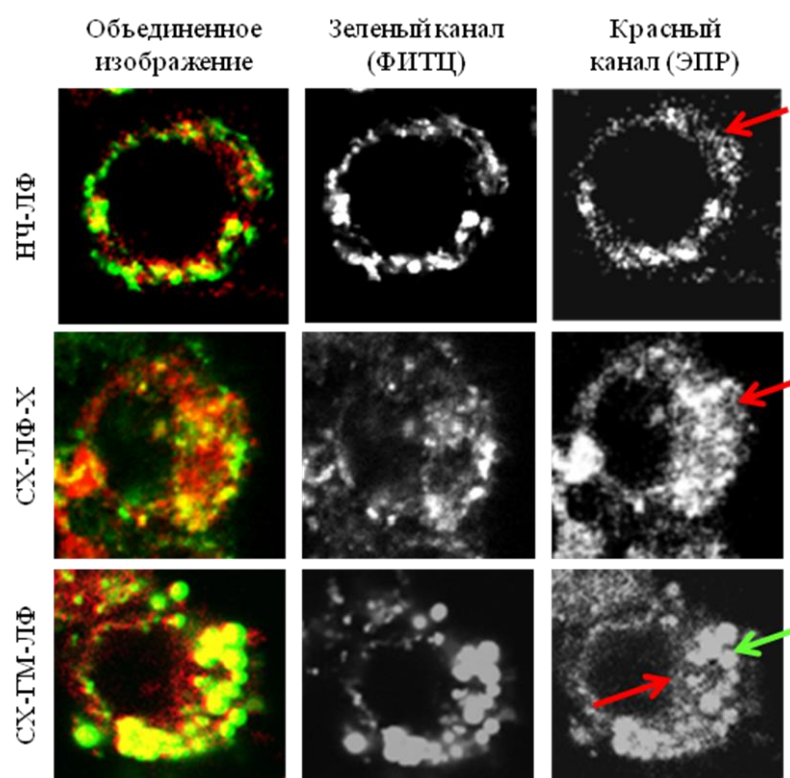


Рисунок 16 – Колокализация наночастиц с ЭПР. Конфокальные изображения отдельных клеток линии RAW 264.7, инкубированных с частицами ЛФ, СХ-ЛФ-Х и ЛФ-ГМ-ЛФ (зеленые) в течение 24 ч и ЭПР (красный)

Таким образом, показано изменение типа иммунного ответа при включении белков в полисахаридную матрицу различного состава, что может быть перспективным для формирования требуемого типа иммунного ответа, например, для разработки противовирусных вакцин.

## Выводы

1. Оптимизирована методика получения наночастиц с помощью термической обработки белка;
2. Получено 5 типов наночастиц, различающихся по размеру, заряду, гидрофобности, наличию векторной молекулы, и определены их физико-химические характеристики;
3. Методами *in vitro* показано, что внутриклеточная локализация частиц зависела от полисахаридной оболочки и типа клеток. Положительно заряженные частицы частично доставляются в ЭПР и лизосомы макрофагов, а отрицательно заряженные – преимущественно в лизосомы. Эффективность поглощения наночастиц эпителиальными клетками зависит от размера. Предложена гипотеза внутриклеточной сортировки заряженных макромолекул и наночастиц;
4. Методами *in vivo* показано, что декорирование антигена полисахаридами с разными свойствами модифицирует гуморальный и клеточный иммунный ответ. Наличие векторной молекулы - галактоманнана в составе частиц, а также положительно заряженной оболочки из хитозана значительно усиливает формирование клеточного ответа, ассоциированного с повышением титров IgG2a субкласса антител к лактоферрину и пролиферацией CD8<sup>+</sup> Т-клеток;
5. Показано различие в механизмах кросс-презентации лактоферрина в составе наночастиц, содержащих векторную молекулу галактоманнан, опосредованного везикулярным транспортом, и частиц, несущих положительный заряд, опосредованного цитозольным типом.

### Список работ, опубликованных по теме диссертации

#### Статьи в рецензируемых журналах из списка ВАК РФ:

1. Бакулин А. В., Щербинина Т.С., Лопатин С.А., Варламов В.П., Курченко В. П., Ботина С.Г., Агаркова Е. Ю., Харитонов В. Д. Удаление β-лактоглобулина из молочной сыворотки с помощью хитозана // Молочная промышленность, 2012. - № 11, - с. 62-67.
2. Варламов В.П., Щербинина Т.С., Бакулин А. В., Буткевич Т.В., Курченко В. П., Харитонов В. Д., Агаркова Е. Ю., Ботина С.Г.. Выделение β-лактоглобулина из сыворотки: использование различных форм хитозана // Молочная промышленность, 2013. - № 10, - С. 11-12.
3. Щербинина Т. С., Зубарева А. А., Варламов В. П., Свирцевская Е. В. Эффект включения производных хитозана на иммуногенные свойства белковых

наночастиц // Российский иммунологический журнал, 2015, том 9 (18), № 2(1), С. 516-518.

4. Каширина Е. И., Савина А. А., Щербинина Т. С. Характеристика иммунного ответа на противоаллергенную капсулированную вакцину// Российский иммунологический журнал, 2015, том 9 (18), № 2(1), С. 245-246.

5. Лялина Т.С., Зубарева А.А., Свирщевская Е.В. Роль маннозного рецептора в кросс-презентации капсулированного антигена // Известия Уфимского научного центра РАН, 2016. № 3(1). С. 68-71.

#### **Статьи в других журналах:**

1. Anastasia A. Zubareva, Tatyana S. Shcherbinina, Valery P. Varlamov, Elena V. Svirshchevskaya. Biodistribution of doxorubicin-loaded succinoyl chitosan nanoparticles in mice injected by intravenous or intranasal routes //Progress in the Chemistry and Application of Chitin and its Derivatives, 2014. - V. XIX, P. 145-154.

2. Zubareva A., Shcherbinina T., Varlamov V., Svirshchevskaya E. Intracellular Sorting of Differently Charged Chitosan Derivatives and Chitosan-Based Nanoparticles // Nanoscale, 2015. - Apr 24, 7(17), - P. 7942-7952.

#### **Патенты:**

1. Бакулин А.В., Лопатин С.А., Щербинина Т.С., Варламов В.П., Курченко В.П., Агаркова Е.Ю., Харитонов В.Д., Ботина С.Г. «Способ обработки молочной сыворотки» авторов Патент РФ №2510849. Опубликовано 10.04.2014. Бюл. №10.

#### **Тезисы докладов:**

1. Щербинина Т.С., Капустин М.А., Лопатин С.А., Курченко В.П. Выделение лактоферрина с использованием нового катионного сорбента «Диасфер АК Сульфо»/ Перспективные ферментные препараты и биотехнологические процессы в технологиях продуктов питания и кормов. Сборник научных трудов. – М.: ВНИИПБТ, 2012. - с. 251.

2. Щербинина Т.С., Куликов С.Н., Ильина А.В., Варламов В.П. Исследование антимикробных, антиоксидантных и ферментативных свойств лактоферрина// Материалы VI Российского симпозиума Белки и пептиды. Уфа, 11-15 июня 2013 г., с. 243.

3. Щербинина Т.С., Зубарева А.А., Варламов В.П. Получение частиц на основе хитозана и лактоферрина для преодоления гемато-энцефалического барьера // Материалы XXVI зимней молодежной научной школы "Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии". Москва, 10-14 февраля 2014 г. – с. 152.

4. Щербинина Т.С., Зубарева А.А., Курек Д.В., Варламов В.П., Получение и характеристика наночастиц на основе производных хитозана и лактоферрина// Материалы 12-й Международной конференции “Современные

перспективы в исследовании хитина и хитозана” РосХит 2014, Пермь, 23-28 июня 2014 года. – с. 392-397.

5. T. Shcherbinina, A. Zubareva, E. Svirshchetskaya, V. Varlamov Characterization of lactoferrin-succinoyl-chitosan nanoparticles developed by controlled heat treatment// Materials of 22nd Annual International Conference on Composites or Nano Engineering (ICCE-22), Saint Julien, Malta, 13th -19th July 2014.

6. Щербинина Т.С., Варламов В.П., Свирщевская Е.В., Иммуногенные свойства белков, капсулированных в полимерные наночастицы// Материалы Международной конференции по биоорганической химии, биотехнологии и бионанотехнологии, посвященная 55-летию Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук и 80-летию со дня рождения академика Ю.А. Овчинникова, Москва, 15-19 сентября 2014 года. – с. 66 (ACTA NATURAE, спецвыпуск №1, 2014)

7. Shcherbinina Tatiana, Zubareva Anastasia, Varlamov Valery, Svirshchetskaya Elena Influence of polysaccharide shell on immunogenic properties of protein nanoparticles//Materials of 13th EAACI Immunology Winter School “Basic Immunology Research In Allergy and Clinical Immunology” 5-8 February 2015, Les Arcs 1800, France. – p. 38.

8. Щербинина Т.С., Варламов В.П., Свирщевская Е.В. Распознавание капсулированных белков Т-клетками // Материалы XXVII Зимней Молодежной Научной Школы «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии» Москва, 9-12 февраля 2015 г, с 168

9. Лялина Т.С., Зубарева А.А., Варламов В.П., Свирщевская Е.В. Исследование захвата белково-полисахаридных частиц клетками макрофагов с использованием тушения флуоресценции трипаном синим // Материалы XXVII Зимней Молодежной Научной Школы «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии» Москва, 8-11 февраля 2016 г, с 143.