

СТИМУЛИРУЮЩЕЕ ВЛИЯНИЕ ФУЛЛЕРЕНА C₆₀ НА ПРОДУКЦИЮ ГЕМАГГЛЮТИНИНОВ И ГЕМОЛИЗИНОВ, УРОВЕНЬ АКТИВНОСТИ КОМПЛЕМЕНТА ВО ВРЕМЯ ПЕРВИЧНОГО ИММУННОГО ОТВЕТА У МЫШЕЙ ЛИНИИ BALB/C

Л.Э. Веснина, Т.В. Мамонтова, М.В. Микитюк, Н.А. Боброва,
И.П. Кайдашеев

НИИ генетических и иммунологических основ развития
патологии и фармакогенетики

Украинской медицинской стоматологической академии, Полтава, Украина

Проведено исследование влияния водной дисперсии FC₆₀ на продукцию гемагглютининов, гемолизинов и активность системы комплемента во время первичного иммунного ответа на гетероантигены. Для индукции первичного иммунного ответа на гетероантигены мышей линии Balb/c иммунизировали путем однократного введения 2% суспензии эритроцитов барана (ЭБ). Водную дисперсию FC₆₀ вводили животным внутрибрюшинно в дозе 50 нг в 100 мкл стерильного фосфатно-солевого буфера на фоне иммунизации ЭБ в течение 1, 3 и 6 дней. Титр гемагглютининов определяли в реакции гемагглютинации, титр гемолизинов – в реакции иммунного лизиса, активность компонентов комплемента – методом иммунного гемолиза. Согласно результатам, при индукции первичного иммунного ответа введение FC₆₀ способствует усилению продукции гемагглютининов и гемолизинов, особенно в фазу начальной и максимальной выработки антител. Введение FC₆₀ индуцирует активацию системы комплемента и увеличивает ее активность при развитии иммунного ответа. Полученные данные свидетельствуют о наличии у FC₆₀ иммуностимулирующих свойств, которые направлены как на врожденные неспецифические факторы иммунной защиты, к которым относится система комплемента, так и на специфические механизмы иммунитета (выработка антител).

Ключевые слова: фуллерен C₆₀, иммунный ответ, гемагглютинация, гемолиз, комплемент.

Адрес для корреспонденции: Профессор И.П. Кайдашеев
НИИ генетических и иммунологических основ развития патологии и
фармакогенетики ВГУЗУ УМСА, 36024 Украина, Полтава, ул. Шевченко,
23
E-mail: congress2007@yandex.ru

УДК 612.017:615.916'26

Стремительный прогресс нанобиотехнологии в значительной мере стимулировал рост интереса к применению в медицине нового класса наноматериалов – фуллеренов. На сегодняшний день изучение фуллеренов как принципиально новых лекарственных средств, способных к целевой адресной доставке и практически безопасных в применении стало одним из приоритетных направлений современной медицины в формировании диагностических и терапевтических стратегий [14, 15].

Фуллерен C₆₀ (FC₆₀) является одним из представителей фуллеренов и представляет сферическую, диаметром 0,72 нм молекулу, состоящую из 60 атомов углерода с уникальными физико-химическими свойствами. Особую ценность представляют ключевые свойства фуллерена: малый размер молекулы, гидрофобная сфера, большая поверхность, способность к взаимодействию с различными молекулами и достаточно быстрое проникновение через мембрану внутрь клетки [22].

Данные свойства FC₆₀ уже успешно применяются при лечении аллергических, онкологических, нейродегенеративных и аутоиммунных заболеваний [8].

В последние годы стало известно, что FC₆₀ и его производные могут оказывать влияние на иммунные процессы [24]. Отмечено, что FC₆₀ регулирует некоторые этапы фагоцитоза, стимулирует адгезию и миграцию нейтрофилов и макрофагов [11, 17]. Получены данные о способности FC₆₀ и его производных разнонаправлено влиять на активацию компонентов комплемента и гемолитических реакций [12, 14, 21].

Эти результаты свидетельствуют о том, что роль FC₆₀ в иммунных процессах до конца не выяснена и требует дальнейшего изучения.

В связи с этим целью работы стало исследование влияния водной дисперсии FC₆₀ на продукцию гемагглютининов и гемолизинов и активность системы комплемента во время первичного иммунного ответа на гетероантигены.

Материалы и методы

Исследование проведено на самцах мышей линии Balb/c (n=36) в возрасте 10–12 недель. Животные находились в стандартных условиях вивария. Все манипуляции осуществляли в соответствии с разрешением комиссии по биоэтике Высшего государственного учебного заведения Украины «Украинская медицинская стоматологическая академия».

Для индукции первичного иммунного ответа на гетероантигены мышей иммунизировали однократным внутрибрюшинным введением 2% суспензии эритроцитов барана (ЭБ) (НВЛ «Гранум», Харьков, Украина) в 0,15 М растворе хлорида натрия в дозе 2×10^8 клеток на животное [6].

Для получения водной дисперсии фуллерен C₆₀ (Sigma, США) перемешивали со стерильной деионизированной водой в асептических условиях на магнитной мешалке в течение 2 месяцев [13]. Животным внутрибрюшинно вводили водную дисперсию FC₆₀ в дозе 50 нг в 100 мкл стерильного фосфатно-солевого буфера (pH=7,2) [20].

Животные были разделены на шесть групп: интактные мыши; мыши первой контрольной группы получали FC₆₀ ежедневно в течение 3 дней, второй были иммунизированы ЭБ; мышам опытных групп вводили FC₆₀ на фоне иммунизации ЭБ соответственно в течение 1, 3 и 6 дней. Эвтаназию животных проводили методом цервикальной дислокации на 7 день эксперимента. Для получения сыворотки кровь забирали из правого предсердия в пластиковые шприцы.

Для определения титра гемагглютининов проводили реакцию гемагглютинации [4]. Для этого в микротитрационные планшеты разливали по 0,05 мл физиологического раствора в ряды из 10 лунок. Из общего количества сыворотки, инактивированной при 56°C в течение 30 мин, брали 0,01 мл и выполняли разведения от 1:1 до 1:1024. К каждому разведению добавляли по 0,05 мл 2% взвеси ЭБ. Помещали планшет на 1 ч в термостат при 37°C. При учете реакции за искомый титр гемагглютининов принимали наибольшее разведение, в котором еще определялась гемагглютинация эритроцитов.

Титр гемолизина определяли с помощью реакции иммунного лизиса [4]. В микротитрационные планшеты разливали по 0,05 мл физиологического раствора в ряды из 10 лунок. Отбирали сыворотку в объеме 0,01 мл и проводили разведения от 1:1 до 1:1024. К каждому разведению добавляли по 0,05 мл 2% взвеси ЭБ, затем инкубировали в течение 1 ч в термостате при 37°C. При оценке реакции за искомый титр гемолизина принимали наибольшее разведение сыворотки, в котором наблюдался гемолиз эритроцитов.

Общую активность компонентов комплемента определяли методом иммунного гемолиза в агарозном геле, основанном на комплемент-зависимом лизисе нагруженных антителами эритроцитов [4, 5]. Предварительно приготовленную гемолитическую систему, состоящую из гемолитической сыворотки, ЭБ и физиологического раствора, смешивали с равным объемом 2% раствора агарозы на буферной основе. Гель-индикаторную смесь наслаивали тонким слоем на химически чистую стеклянную пластинку размером

10×15 см и охлаждали. Пробойником делали микрорунки диаметром 2 мм на расстоянии 1 см друг от друга. Вносили в лунки по 0,003 мл исследуемой сыворотки. После этого пластину помещали во влажную камеру и устанавливали в термостат при 37°C на 12 ч. Учет уровня активности комплемента в исследуемых сыворотках проводили по диаметру кольца лизиса сенсibilизированных антителами ЭБ, сопоставляя его с кольцом лизиса контрольной сыворотки. Зоны гемолиза измеряли визуально с помощью стереоскопического микроскопа МБС-9 с применением окуляра-микрометра. Оценка результатов проводили с учетом того, что величина зоны гемолиза пропорциональна активности комплемента.

Статистическую обработку материала проводили с помощью программы Statistica 6.0 (StatSoft, США) с вычислением среднего геометрического (x_г) относительных величин титров с использованием двойных логарифмов (log₂), среднего арифметического (M) и стандартной ошибки (m). Определение достоверности различий проводили с помощью непараметрических критериев Манна–Уитни и Ван-дер-Вердена. Достоверными считали результаты при p<0,05.

Результаты

Развитие первичного иммунного ответа при иммунизации животных ЭБ сопровождается выработкой преимущественно IgM антител [2]. Синтез IgM происходит в несколько этапов: приблизительно через 2 дня после инъекции ЭБ (индуктивная фаза) появляются IgM-продуцирующие клетки (продуктивная фаза), количество которых увеличивается и достигает максимума к 5–6 дню [7, 9]. Поэтому нами были выбраны сроки введения FC₆₀ на фоне иммунизации соответственно: в 1 день – отсутствие антител, 3 дня – развитие иммунного ответа, 6 дней – наиболее высокий уровень иммунного ответа с максимальным титром антител.

На первом этапе исследования было изучено влияние FC₆₀ на продукцию гемагглютининов (табл. 1). Реакция гемагглютинации отсутствовала в сыворотке мышей интактной группы и была минимальной на фоне введения мышам FC₆₀ в течение 3 дней (контроль 1).

Следует отметить, что в сыворотках мышей контрольной группы, получавших FC₆₀ в течение 3 дней, определялся низкий титр также и гемолизина. По всей видимости, это свидетельствует о наличии гетерофильных антител IgM к антигенам животных неродственных видов, как например – барана, которые в низком титре могут присутствовать в крови здоровых людей и животных.

В сыворотке крови всех мышей, иммунизированных ЭБ (контроль 2) наблюдали появление гемагглютининов в титре до 1:128. У мышей опытных групп, независимо от сроков введения FC₆₀ на фоне иммунизации отмечено достоверное повышение продукции гемагглютининов по сравнению с мышами, иммунизированными ЭБ (табл. 1).

Результаты свидетельствуют о способности FC₆₀ стимулировать продукцию антител, обладающих свойствами гемагглютининов, что приводит к усилению первичного иммунного ответа на гетероантиген.

Таблица 1

Влияние FC_{60} на продукцию гемагглютининов и гемолизинов при развитии первичного иммунного ответа у мышей линии Balb/c через 6 дней после иммунизации эритроцитами барана

Титр антител	Интактные мыши (n=6)	Введение FC_{60} 3 дня (n=6)	Иммунизация ЭБ (n=6)	Длительность введения FC_{60} после иммунизации ЭБ		
				1 день (n=6)	3 дня (n=6)	6 дней (n=6)
Титр гемагглютининов (log2)	0	0,33±0,21	7,0±0	8,5±0,22*	8,33±0,42*	8,5±0,22*
Титр гемолизинов (log2)	0	0,5±0,22	7,5±0,22	7,5±0,22	8,0±0,44*	7,83±0,54*

Примечание: * $p < 0,01$ по сравнению с группой, иммунизированной эритроцитами барана.

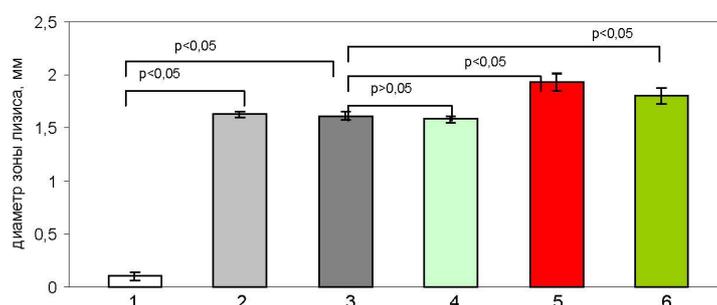


Рис. 1. Влияние FC_{60} на уровень активности комплемента при развитии первичного иммунного ответа у мышей линии Balb/c через 6 дней после иммунизации эритроцитами барана. По оси абсцисс: 1 – интактные мыши; 2 – введение FC_{60} 3 дня; 3 – иммунизация эритроцитами барана; 4 – введение FC_{60} на фоне иммунизации эритроцитами барана 1 день; 5 – введение FC_{60} на фоне иммунизации эритроцитами барана 3 дня; 6 – введение FC_{60} на фоне иммунизации эритроцитами барана 6 дней.

Как известно, антиэритроцитарные IgM-антитела, продуцируемые антителообразующей клеткой, обладая высокой комплемент-связывающей активностью, способны непосредственно вызывать комплемент-зависимый гемолиз [2]. Поэтому на следующем этапе исследования оценивали влияние FC_{60} на продукцию гемолизинов (табл. 1). У мышей интактной группы гемолизины в сыворотке отсутствовали. В группе иммунизированных животных были выявлены гемолизины в титре до 1:256. Достоверное увеличение продукции гемолизинов отмечено при введении FC_{60} иммунизированному животному в течение 3 и 6 дней. Таким образом, полученные данные показывают стимулирующее воздействие FC_{60} на повышение продукции гемолизинов при развитии первичного иммунного ответа.

Оценка активности комплемента, важного компонента неспецифической иммунной защиты, проводили методом иммунного гемолиза в геле агарозы (рис. 1). Достоверное увеличение активности комплемента по сравнению с показателями интактной группы наблюдалось в обеих контрольных группах - при введении FC_{60} в течение 3 дней и при иммунизации ЭБ, о чем свидетельствует увеличение зон лизиса. Введение FC_{60} в течение 3 и 6 дней на фоне иммунизации привело к увеличению активности комплемента по сравнению с иммунизированными животными. Следовательно, FC_{60} способствовал достоверному увеличению активности комплемента у неиммунизированных животных и у животных на фоне развития первичного иммунного ответа.

Обсуждение

Одним из важнейших этапов развития первичного иммунного ответа на антиген является продукция антител, что позволяет обеспечить поддержание антигенного гомеостаза, усиление бактерицидной активности сыворотки с последующим фагоцитозом образовавшегося комплекса антиген-антитело. В данном исследовании для индукции первичного иммунного ответа были использованы ЭБ, которые, выступая в качестве гетерологичных тимусзависимых антигенов, оптимально способствуют стимуляции выработки антител класса IgM [3]. Антиэритроцитарные антитела, взаимодействуя с эритроцитами, вызывают агглютинацию. Реакция гемагглютинации, основанная на способности антител перекрестно связываться с эритроцитами путем взаимодействия с их поверхностными антигенами, ведет к образованию иммунных комплексов, связывающих комплемент при его активации по классическому пути [7]. У большинства видов животных гемагглютинирующими свойствами обладают как IgM, так и IgG. В то же время, антитела IgM более эффективны в реакции гемагглютинации, поскольку отличаются высокой валентностью [2]. Уровень выработки гемагглютининов отражает интенсивность развития первичного иммунного ответа.

В нашем исследовании установлено, что введение FC_{60} в течение 1, 3 и 6 дней на фоне иммунизации приводит к достоверному увеличению выработки

Л.Э. Веснина, Т.В. Мамонтова, М.В. Микитюк, Н.А. Боброва, И.П. Кайдашев

антител класса IgM как в самом начале иммунного ответа, так и при его максимальном развитии.

В основе иммуноопосредованного гемолиза лежит механизм активации комплемента комплексом антиген-антитело и последующий запуск гемолитических реакций в эритроцитах-мишенях [2]. Антитела IgM обладают более высокой комплемент-связывающей активностью и соответственно вызывают более активный процесс гемолиза.

Иммунизация животных ЭБ приводила к формированию высокого титра гемолизина. Достоверное повышение продукции гемолизина в нашем исследовании наблюдалось при введении FC₆₀ в течение 3 и 6 дней - на фоне развития первичного иммунного ответа на ЭБ и при достижении максимума продукции антиэритроцитарных антител - на 6 день.

Полученные нами данные согласуются с результатами изучения возможных адьювантных свойств - усиления иммуногенной активности слабых антигенов с помощью фуллеренов. Исследование кристаллического FC₆₀, синтезированных пептидных и аминокислотных дериватов фуллеренов показали, что большая часть его соединений обладает адьювантной активностью, стимулируя IgG-ответ на совместное введение производного фуллерена с антигеном в физиологическом растворе [1, 10, 16].

Система комплемента является одной из наиболее древних составляющих реакций врожденного иммунного ответа, представленной более чем 30 белками плазмы крови. Основная роль комплемента состоит в комплексной интеграции с другими системами для удаления патогенных организмов, иммунных комплексов или апоптотических клеток, стимуляции миграции нейтрофилов и регуляции воспаления [23]. Активировать запуск комплемента по классическому пути способны антитела IgM и некоторые подклассы IgG после специфического взаимодействия с антигеном [18, 19].

При использовании метода иммунного гемолиза в агарозном геле наблюдалось достоверное увеличение активности комплемента в сыворотках мышей, которым вводили FC₆₀ в течение 3 дней. Активность комплемента увеличивалась при введении FC₆₀ в

течение 3 и 6 дней на фоне развития первичного иммунного ответа. Таким образом, FC₆₀ может индуцировать активацию системы комплемента и повышать ее активность при развитии иммунного ответа на гетероантигены.

В то же время согласно данным литературы, наночастицы могут оказывать влияние на компоненты комплемента в разной степени, что обусловлено их поверхностными свойствами, размером, плотностью и реактивностью присоединенных групп. Более активную стимуляцию комплемента могут вызывать модифицированные наночастицы (липидные нанокapsулы, полистирольные наносферы, полипропилен-сульфидные наночастицы), тогда как нативные наночастицы, такие как FC₆₀, умеренно влияют или не воздействуют на него [14].

В целом, при индукции первичного иммунного ответа введение FC₆₀ способствует усилению продукции геммагглютининов и гемолизина особенно в начале выработки антител и в фазу максимальной выработки, индуцирует активацию системы комплемента и увеличивает ее активность при развитии первичного иммунного ответа у мышей линии Balb/c.

Результаты исследования показывают наличие у FC₆₀ иммуностимулирующих свойств, которые направлены как на врожденные неспецифические факторы иммунной защиты, к которым относится система комплемента, так и на специфические механизмы иммунитета (выработка антител), что в конечном итоге обеспечивает надежное взаимодействие и реализацию ключевых эффекторных механизмов иммунного ответа.

Полученные данные, на наш взгляд, представляют не только научную, но и потенциальную практическую ценность и могут быть использованы в дальнейшей разработке на основе FC₆₀ перспективных средств иммуномодулирующей терапии.

Данная работа является фрагментом научно-исследовательской работы, финансируемой Министерством здравоохранения Украины № 0109U001628 «Разработка методов иммуномодуляции с использованием наночастиц».

Литература

1. Андреев С.М., Бабахин А.А., Романова В.С. и др. «О генерации антител к фуллерену C₆₀» *Иммунология* **6**: 343–348, 2006.
2. «Антитела. Методы» Кн. 1 (Ред. Д.Кэти) (М.: Мир) 1991.
3. Дранник Г.Н. «Клиническая иммунология и аллергология: Учебное пособие» (Одесса: Астропринт) 1999.
4. «Иммунологические методы» (Ред. Г. Фримель) (М.: Медицина) 1987.
5. Мотавкина Н.С., Ковалев Б.М., Шаронов А.С. «Микрометод определения комплементарной активности сывороток крови и других биологических жидкостей.» *Лаб. дело* **7**: 431–434, 1980.
6. Пастер Е.У., Овод В.В., Позур В.К., Вихоть Н.Е. «Иммунология: Практикум» (Киев: Вища школа) 1989.
7. Рабсон А., Ройт А., Делвз П. «Основы медицинской иммунологии» Пер. с англ. (М.: Мир) 2006.
8. Розенфельд Л.Г., Москаленко В.Ф., Чекман И.С., Мовчан Б.О. «Нанотехнології, наномедицина: перспективи наукових досліджень та впровадження їх результатів у медичну практику.» *Укр. мед. часопис* **5 (67)**: 63–68, 2008.
9. Фримель Г., Брок Й. «Основы иммунологии» (М.: Мир) 1986.
10. Andrievsky V.K., Klochkov L.I., Derevyanchenko I.S. "Is C₆₀ fullerene molecule toxic?!" *Fullerenes, Nanotubes, Carbon Nanostructures* **13 (4)**: 363–375, 2005.
11. Bartneck M., Keul H.A, Zwadlo-Klarwasser G. et al. "Phagocytosis independent extracellular nanoparticle clearance by human immune cells." *Nano Lett.* **10 (1)**: 59–63, 2010.

12. Bossi S. "Hemolytic effects of water-soluble fullerene derivatives". *J. Med. Chem.* **47**: 6711–6715, 2004.
13. Dhavan A., Taurozzi J.S., Pandey A.K. et al. "Stable colloidal dispersion of C₆₀ fullerenes in water: evidence for genotoxicity." *Environ. Sci. Technol.* **40**: 7394–7401, 2006.
14. Dobrovolskaia M.A., Aggrawal P., Hall J.B., McNeil S.E. "Preclinical studies to understand nanoparticle interaction with the immune system and its potential effects on nanoparticle biodistribution." *Mol. Pharm.* **5** (4): 487–495, 2008.
15. Jain R.K., Stylianopoulos T. "Delivering nanomedicine to solid tumors." *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **7**: 653–664, 2010.
16. Kotelnikova R.A., Bogdanov G.N., Frog E.C. et al. "Nanobionics of pharmacologically active derivatives of fullerene C₆₀." *J. Nanoparticle Research* **5** (5–6): 561–566, 2003.
17. Morimoto Y., Hirohashi M., Ogami A., et al. "Inflammatory effect of well-characterized fullerenes in inhalation and intratracheal instillation studies." *Particle Fibre Toxicology* **7**: 1–4, 2010.
18. Pedersen M.B., Zhou X., Larsen E.K.U. "Curvature of synthetic and natural surfaces is an important target feature in classical pathway complement activation." *J. Immunology* **184**: 1931–1945, 2010.
19. Pilzer D., Fishelson Z. "Mortalin/GRP75 promotes release of membrane vesicles from immune attacked cells and protection from complement-mediated lysis." *Int. Immunol.* **17** (9): 1239–1248, 2005.
20. Rayan J.J., Bateman H.R., Stover A. et al. "Fullerene nanomaterials inhibit the allergic response." *J. Immunol.* **179**: 665–672, 2007.
21. Reddy S.T., van der Vlies A.J., Simeoni E., Angeli V. et al. "Exploiting lymphatic transport and complement activation in nanoparticle vaccines." *Nat. Biotechnol.* **25** (10): 1159–1164, 2007.
22. Saton M., Takayanagi I. "Pharmacological studies on fullerene C₆₀, a novel carbon allotrope, and its derivate." *J. Pharmacol. Sci.* **100**: 513–518, 2006.
23. Thurman J.M., Renner B. "Dynamic control of the complement system by modulated expression of regulatory protein." *Lab. Investigation* **91**: 4–11, 2011.
24. Zolnik B.S., González-Fernández A., Sadrieh N., Dobrovolskaia M.A. "Nanoparticles and the immune system." *Endocrinology* **151** (2): 458–465, 2010.

Stimulatory effect of fullerene C₆₀ on production of hemagglutinins and hemolysins, level activity of complement during the primary immune response in Balb/c mice

L.E. Vesnina, T.V. Mamontova, M.V. Mikituk, N.A. Bobrova, I.P. Kaidashev

Research Institute for Genetic and Immunological Grounds of Pathology and Pharmacogenetics, Ukrainian Medical Stomatological Academy, Poltava

The influence of water dispersion fullerene C₆₀ (FC₆₀) on production of hemagglutinins, hemolysins and level activity of complement during the primary immune response to heteroantigens were studied. Mice were immunized by 2% suspension of ram red blood cells for induction of the primary immune response to heteroantigens. Mice were treated intraperitoneally with 50 ng of FC₆₀ in 100 µl of phosphate-buffered saline (PBS) during 1, 3 and 6 days after induction of the primary immune response. Titre of hemagglutinins was determined by reaction of hemagglutination, titre of hemolysins - by reaction of immune lysis, activity of complement - by immune hemolysis. According to the results, treatment with FC₆₀ during induction of the primary immune response induces the production of hemagglutinins and hemolysins, especially in initial and maximum phases of the generation antibodies. Treatment with FC₆₀ stimulates the complement system activation and enlarges its activity after induction of the primary immune response. The results suggest that FC₆₀ can display immunomodulatory properties which are directed on the innate nonspecific factors of immune defence, such as complement system and on the specific mechanisms (production antibodies).

Key words: fullerene C₆₀, immune response, hemagglutination, hemolysis, complement.