

АД'ЮВАНТНІ ВЛАСТИВОСТІ ПОЛІМЕРУ НА ОСНОВІ АКРИЛОВОЇ КИСЛОТИ

М. Р. КОЗАК¹, А. В. ОЛІЙНИК¹, О. С. ЗАІЧЕНКО², В. В. ВЛІЗЛО¹

¹Інститут біології тварин НААН України, Львів;

²Національний університет «Львівська політехніка», Україна;

e-mail: mariya_kozak@yahoo.com

Недоліки традиційних вакцин спонукають до пошуку нових речовин з ад'ювантними властивостями. У роботі досліджено полімер на основі акрилової кислоти з метою виявлення його імуногенних та ад'ювантних властивостей. За допомогою дот-блот та імуноензимного аналізу виявлено антитіла у крові мишей до протеїнів овалбуміну і БСА за застосування досліджуваного полімеру як носія цих протеїнових антигенів. Показано, що полімер має кращі ад'ювантні властивості, порівняно з традиційним гідроксидом алюмінію, який є компонентом багатьох вакцин, оскільки він призводить до зростання кількості специфічних антитіл до овалбуміну та БСА.

Ключові слова: ад'ювант, полімер акрилової кислоти, дот-блот аналіз, імуноензимний аналіз.

Для профілактики інфекційних захворювань людини та тварин використовують вакцини. Традиційні вакцини виготовляють на основі живих, ослаблених або вбитих збудників хвороб. Це має низку недоліків, зокрема високу вартість, ризик потрапляння в готову вакцину недостатньо ослабленого чи живого збудника, неможливість виростити в культурі окремі віруси, наприклад, ретровірус, що зумовлює синдром набутого імунодефіциту (СНІД) [1].

Введення вакцини індукує синтез антитіл до антигенних детермінант, які в нормі присутні на поверхні вірусної частинки. Тому, очевидно, що таку ж відповідь спричиняють короткі синтетичні пептиди із аналогічною амінокислотною послідовністю. Наприклад, було синтезовано серію пептидів вірусу ящуру і з'єднано із протеїном-переносником [2]. Внаслідок імунізації цими комплексами кроликів у них виявлено захисні антитіла на введення інтактного вірусу. Молекулярні підходи сучасної біології дозволяють створити будь-які рекомбінантні протеїнові антигени. Однак такі речовини є низькоімуногенними або зовсім не імуногенними і потребують застосування ад'юванта, щоб забезпечити сильну і тривалу відповідь імунної системи.

Протягом останніх 80 років було експериментально досліджено багато ад'ювантів, проте лише сполуки алюмінію застосовуються у разі створення вакцин [3]. Під час їх взаємодії з розчинним антигеном утворюються преципітати, що забезпечує повільне вивільнення протеїну із утвореного ком-

плексу і, як наслідок, пролонгацію реакції антитілоутворення [4, 5]. На думку деяких вчених [5], сполуки алюмінію як ад'юванти мають ряд недоліків, зокрема зумовлюють алергію [6], розвиток хвороби Альцгеймера [7] і т. д.

У доклінічних дослідженнях, як носії для антигену часто використовують полімерні наночастинки різного складу і розміру [8, 9]. Клінічні випробування проходять сполуки монофосфорилліпиду А, Мf-59 (олійно-водна емульсія, що містить сквален), віросоми [10].

Тому, зважаючи на появу нових вірусних захворювань і недоліки традиційних вакцин, метою нашої роботи є пошук і дослідження нових речовин із ад'ювантними властивостями для створення засобів специфічної профілактики.

Матеріали і методи

Полімер МГ-4 синтезовано на основі гліцидилметакрилату, акрилової кислоти, триетиленглікольметакрилату та бутілакрилату (рис. 1) на кафедрі органічної хімії Національного університету «Львівська політехніка» [11].

Дослідження проводили на білих нелінійних мишах 5-місячного віку, яких було поділено на 8 груп по 5 тварин у кожній (1 контрольна та 7 дослідних). Тваринам контрольної групи підшкірно вводили 40 мкл 0,9%-го ізотонічного розчину NaCl. Мишам першої дослідної групи підшкірно вводили 40 мкл розчину полімеру МГ-4 (40 мг/мл); другої – 40 мкл суміші МГ-4 (40 мг/

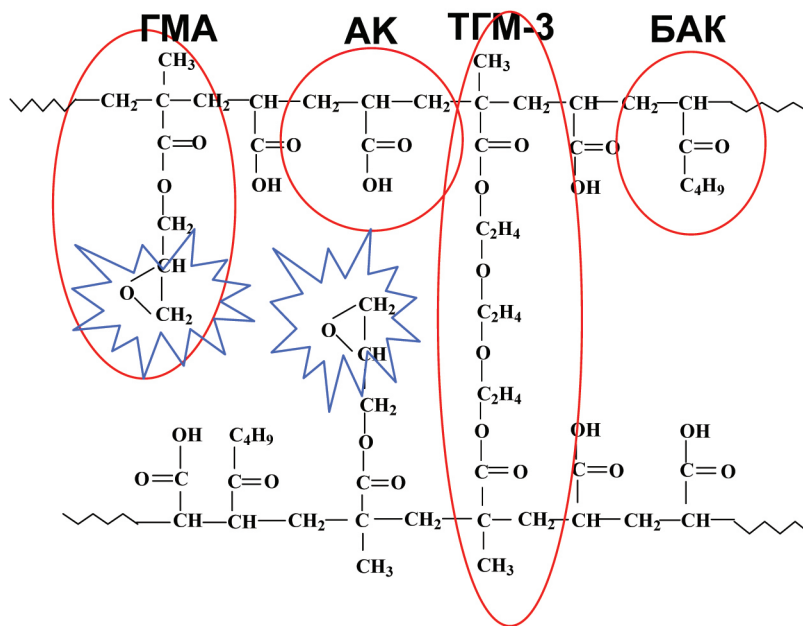



Рис. 1. Структурна формула полімеру МГ-4: ГМА – гліцидилметакрилат, АК – акрилова кислота, ТГМ-3 – триетиленглікольметакрилат, БАК – бутилакрилат,  – епоксидні групи

мл) та БСА 100 мг/мл (AppliChem GmbH, Німеччина) в об'ємному співвідношенні (1 : 1); третьої – 40 мкл суміші алюміній гідроксиду (80 мг/мл) та БСА (100 мг/мл) в об'ємному співвідношенні (1 : 1); четвертої – 40 мкл суміші МГ-4 (40 мг/мл) та овальбуміну (MP Biomedicals, Польща) 100 мг/мл; п'ятої – 40 мкл суміші алюміній гідроксиду (80 мг/мл) та овальбуміну (100 мг/мл); шостої – 40 мкл розчину БСА (100 мг/мл); сьомої – 40 мкл розчину овальбуміну (100 мг/мл).

Імунізацію проводили на 7-, 14- та 21-й день. Через тиждень після останньої ін'єкції тварин під наркозом декапітували (хлороформ, Сфера Сім, Україна) шляхом цервікальної дислокації, після цього відбирали кров.

Імуноглобуліни виділяли із сироватки крові мишей за допомогою триразового осадження насиченим розчином сульфату амонію.

Появу антитіл до овальбуміну детектували за допомогою дот-блот аналізу. Зокрема, на нітроцелюлозну мембрану наносили по 2 мкл 10%-го розчину овальбуміну та блокували в знежиреному сухому молоці впродовж 10 хв; після повного висихання краплі наносили одержані із сироватки крові мишей препарати імуноглобулінів; інкубували 30 хв за кімнатної температури; відмивали буфером (TBS + сухе молоко + Твін-20); інкубували з іншими антимишачими антитілами 30 хв (Sigma, Німеччина); відмивали буфером (TBS + Твін-20); детекцію сигналу проводили

із субстратом для лужної фосфатази CDPstar (Sigma, Німеччина) на рентгенівській плівці ICL hyperFilm (Amersham, США).

Імуноензимний метод дослідження: 2 мкл 10%-го розчину протеїнів (овальбумін та БСА) сорбували на планшет (РАА, Австрія) протягом 24 год при 4 °С; після цього тричі промивали буфером А (0,2% БСА в забуференому фізіологічному розчині (ЗФР)) та додавали одержані із сироватки крові мишей імуноглобуліни. Інкубували 2 год при 37 °С; тричі промивали буфером А та додавали інші антитіла, кон'юговані з лужною фосфатазою (antimouse (Sigma, Німеччина) в розведенні 1 : 5000); інкубували 1 год при 37 °С; тричі промивали ЗФР-Твін-20; додавали субстрат для лужної фосфатази – *n*-нітрофенілфосфат в діетаноламіні (Філісіт-діагностика, Україна); через 3 хв вимірювали абсорбцію при 405 нм на ELISA рідері STAT FAX (Awareness technology inc., США). Результати аналізів подавали у величинах абсорбції.

Статистичні розрахунки результатів ($M \pm m$) проводили за допомогою комп'ютерної програми Microsoft Excel 2007. Вірогідність відмінностей визначали за *t*-критерієм Стьюдента.

Результати та обговорення

Полімер МГ-4 було використано для імунізації білих нелінійних мишей з метою дослідити його імуногенні та ад'ювантні

властивості. Імунізацію тварин проводили тричі з інтервалом у 7 днів.

Через 7 днів після третьої ін'єкції із сироватки крові було одержано імуноглобуліни завдяки триразовому осадженню сульфатом амонію. Чистоту імуноглобулінів перевіряли за допомогою електрофорезу у 12%-му поліакриламідному гелі.

Появу антитіл у сироватці крові тварин до овальбуміну досліджували за допомогою дот-блот аналізу. Після імунізації мишей овальбуміном з гідроксидом алюмінію, який застосовують у багатьох вакцинах, виявлено антитіла до овальбуміну (рис. 2). Імунізація мишей овальбуміном із полімером спричинила появу антитіл до досліджуваного протеїну (рис. 2). У разі імунізації мишей лише овальбуміном антитіл до нього не виявлено.

Оскільки дот-блот аналіз не дозволяє точно кількісно оцінити вміст специфічних до антигену антитіл, застосовано метод імуноензимного аналізу. Виявлено індивідуальну чутливість мишей як до імунізації овальбуміном, так і в комплексі його з ад'ювантами (гідроксидом алюмінію і полімером). Імунізація овальбуміном не спричинила вірогідного зростання вмісту антитіл до цього протеїну. Застосування гідроксиду алюмінію привело до збільшення кількості специфічних антитіл, але максимально на 19% (рис. 3).

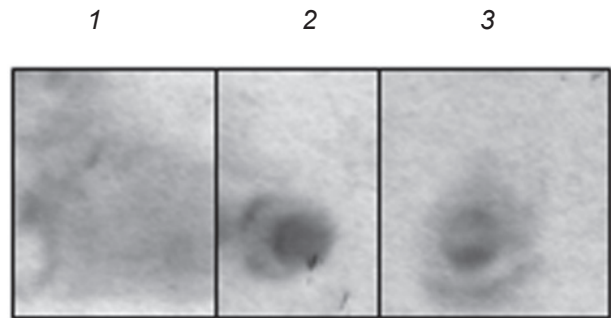


Рис. 2. Дот-блот аналіз появи антитіл у сироватці мишей до овальбуміну: 1 – імунізація овальбуміном; 2 – визначення антитіл після імунізації овальбуміном та алюміній гідроксидом; 3 – визначення антитіл після імунізації овальбуміном та МГ-4

За дії полімеру в комплексі з овальбуміном виявлено індивідуальну сприйнятливості мишей. Зростання вмісту антитіл до овальбуміну в цій групі тварин коливалось від 11 до 220% (рис. 3) порівняно з контрольною групою.

Для вивчення універсальності досліджуваного полімеру, а саме здатності посилювати імунну реакцію до інших протеїнів, мишей було імунізовано БСА. Появу антитіл до нього досліджували за допомогою імуноензимного аналізу.

Застосування класичного ад'юванта – гідроксиду алюмінію спричинило підвищення

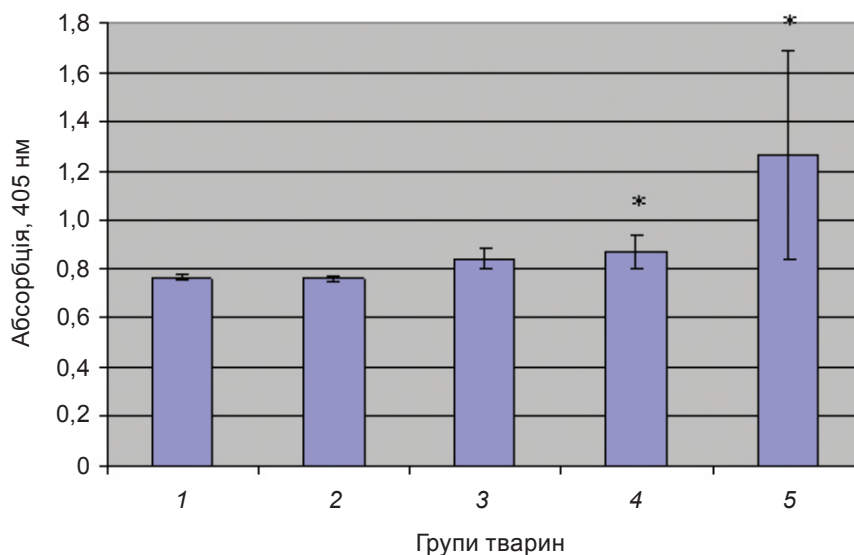


Рис. 3. Імуноензимний аналіз вмісту антитіл до овальбуміну в сироватці крові імунізованих мишей: 1 – контрольна група; 2 – тварини, яким вводили розчин полімеру; 3 – тварини, яким вводили овальбумін; 4 – тварини, яким вводили овальбумін із гідроксидом алюмінію; 5 – тварини, яким вводили овальбумін із полімером, * $P \leq 0, 05$

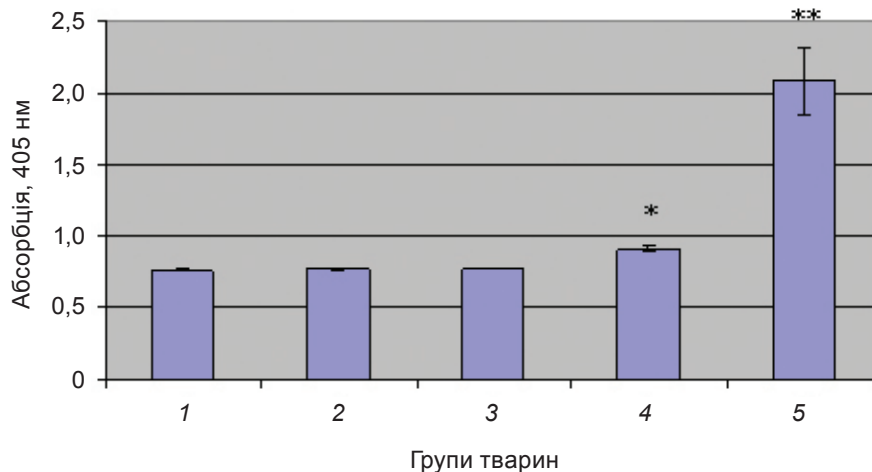


Рис. 4. Імуноензимний аналіз вмісту антитіл проти БСА у сироватці крові імунізованих мишей: 1 – контрольна група; 2 – тварини, яким вводили розчин полімеру; 3 – тварини, яким вводили БСА; 4 – тварини, яким вводили БСА з гідроксидом алюмінію; 5 – тварини, яким вводили БСА з полімером; * $P \leq 0,05$, ** $P \leq 0,01$

кількості антитіл проти БСА у всіх піддослідних тварин на 15% порівняно з контролем (рис. 4).

Полімер МГ-4 продемонстрував високі ад'ювантні властивості, що виявилось зростанням вмісту антитіл до БСА у $2,9 \pm 0,6$ раза.

Ад'ювантні властивості виявлено серед багатьох полімерних сполук, таких як: поліметилметакрилат для вакцини від СНІДу [12], наночастинки, сполучені з вітаміном B_{12} [13], манозаміну, з'єданого з поліангідридом [14] та ін. Наші дослідження демонструють потенційні ад'ювантні властивості полімеру, синтезованого на основі акрилової кислоти. Цей полімер показав удвічі вищі ад'ювантні властивості, ніж гідроксид алюмінію (рис. 4), що можна пояснити такими факторами: 1) утворення міцних ковалентних зв'язків з антигеном завдяки наявності епоксидних груп; 2) утримання антигену в гелевій структурі полімеру та пролонгація реакції імунної системи, внаслідок чого підвищується титр специфічних антитіл.

Підшкірні ін'єкції досліджуваного полімеру не призводили до видимих ушкоджень у піддослідних тварин протягом усього періоду спостереження. Не було набрякання, почервоніння в місці імунізації, шерсть тварин залишалася густою та з відблиском, випадіння її не спостерігали, вага тварин залишалася стабільною. Летальні випадки відсутні.

Через вміст епоксидних груп у структурі полімеру в попередніх дослідженнях також вивчали його дію на антиоксидантну систему мишей [15]. Негативного впливу не вияви-

ли. Всі досліджувані показники були в межах фізіологічних норм, встановлених для мишей [16].

Одержані дані свідчать про високий потенціал досліджуваного полімеру МГ-4 для практичного застосування, оскільки виявлено його імуногенні та ад'ювантні властивості, які необхідні для створення вакцин нового типу.

АДЬЮВАНТНІ СВОЙСТВА ПОЛИМЕРА НА ОСНОВЕ АКРИЛОВОЇ КИСЛОТИ

М. Р. Козак¹, А. В. Олійник¹,
А. С. Заиченко², В. В. Влизло¹

¹Інститут біології живих тварин
НААН України, Львів;

²Национальный университет «Львовская
политехника», Україна;
e-mail: mariya_kozak@yahoo.com

Недостатки традиционных вакцин побуждают к поиску новых веществ с адьювантными свойствами. В работе исследован полимер на основе акриловой кислоты с целью определения его иммуногенных и адьювантных свойств. С помощью дот-блот и иммуноензимного анализа обнаружены антитела в крови мышей к протеинам овальбумина и БСА при применении исследуемого полимера в качестве носителя этих протеиновых антигенов. Показано, что полимер имеет лучшие адьювантные свойства по сравнению с гидроксидом алюминия, который является компонен-

том многих традиционных вакцин, введение его животным приводит к росту количества специфических антител против овальбумина и БСА.

Ключевые слова: адьювант, полимер акриловой кислоты, дот-блот анализ, иммуно-энзимный анализ.

ADJUVANT PROPERTIES OF POLYMER BASED ON ACRYLIC ACID

*M. R. Kozak¹, A. V. Oliynyk¹,
O. S. Zaichenko², V. V. Vlizlo¹*

¹Institute of Animal Biology, National Academy of Agrarian Sciences of Ukraine, Lviv;

²Lviv Polytechnic National University, Ukraine; e-mail: mariya_kozak@yahoo.com

Adjuvant properties of the polymer containing acrylic acid, glycidyl methacrylate, triethylene glycol methacrylate and butyl acrylate have been established. Antibodies to ovalbumin and bovine serum albumin in the blood of mice were revealed using dot blot analysis and immunoenzyme analysis when applying the investigated polymer as a carrier of these protein antigens. Adjuvant properties of the polymer were compared to aluminum hydroxide, which is a component of many traditional vaccines. Experimental polymer was a stronger adjuvant because it led to an increase of specific antibodies against ovalbumin and bovine serum albumin.

Key words: adjuvant, polymer of acrylic acid, dot blot analysis, immunoenzyme analysis.

1. Глик Б., Пастернак Дж. Молекулярная биотехнология. Принципы и применение. — М.: Мир — под ред. Н. К. Янковского, пер. с англ. — 2002. — 589 с.

2. Bittle J. E., Houghten R. A., Alexander H. et al. // *Nature*. — 1982. — **298**, N 5869. — P. 30–33.
3. Spazierer D., Skhavara H., Dawid D. et al. // *Clin. Exp. Allergy*. — 2009. — **39**, N 7. — P. 999–1008.
4. Lindblad E. B. // *Immunol. Cell Biol.* — 2004. — **82**, N 5. — P. 497–505.
5. Baylor N. W., Egan W., Richman P. // *Vaccine*. — 2002. — **20**, N 3. — P. 18–23.
6. Lindblad E. B. // *Vaccine*. — 2004. — **22**, N 27–28. — P. 3658–3668.
7. Martyn C. N., Osmond C., Edwardson J. A. et al. // *Lancet*. — 1989. — **1**, N 8629. — P. 59–62.
8. Foged C., Brodin B., Frokjaer S., Sundblad A. // *Int. J. Pharm.* — 2005. — **298**, N 2. — P. 315–322.
9. Kanchan V., Panda A. K. // *Biomaterials*. — 2007. — **28**, N 35. — P. 5344–5357.
10. Brunner R., Jensen-Jarolim E., Pali-Schöll I. // *Immunol. Lett.* — 2010. — **128**, N 1. — P. 29–35.
11. Москвін М., Олійник А., Міміна Н. та ін. Нові пероксидовмісні пористі гелеві колоїди та наночастинки полі електролітної природи // VI Науково-технічна конференція «Поступ в нафто газопереробній та нафтохімічній промисловості». — Львів. — (25–28 квітня) 2012. — С. 236.
12. Stieneker F., Kreuter J., Lower J. // *AIDS*. — 1991. — **5**, N 4. — P. 431–435.
13. Salman H. V., Gamazo C., de Smidt P. C. et al. // *Pharm. Res.* — 2008. — **25**, N 12. — P. 2859–2867.
14. Salman H. H., Irache J. M., Gamazo C. // *Vaccine*. — 2009. — **27**, N 35. — P. 4784–4790.
15. Олійник А. В., Козак М. Р., Заіченко О. С., Влізло В. В. // *Біологія тварин*. — 2012. — **14**, № 1–2. — С. 174–179.
16. *Лабораторні методи досліджень у біології, тваринництві та ветеринарній медицині. Довідник.* / За ред. В. В. Влізла. — Львів. Сполум. — 2012. — 761 с.

Отримано 26.11.2012