

ИССЛЕДОВАНИЕ АДЬЮВАНТНЫХ СВОЙСТВ СУКЦИНАТА ХИТОЗАНА

*Д.П. Кузнецов, С.М. Шинкарев, А.И. Албулов,
А.Я. Самуйленко, П.А. Кузнецов, М.А. Фролова*

Всероссийский научно-исследовательский и технологический институт
биологической промышленности, Щелково, E-mail: bioprogram@shelkovo.comcor.ru

INVESTIGATION OF ADUVANT ACTIVITY OF SUCCINIC CHITOSAN

*D.P. Kuznetsow, S.M. Shinkarew, A.I. Albulov,
A.Ya. Samujlenko, P.A. Kuznetsow, M.A. Frolova*

Russian Federal Research and Technological Institute of Biological Industry,
Schyolkovo, Moskow region, E-mail: bioprogram@shelkovo.comcor.ru

ABSTRACT

Experimental results of investigation of natrii salt of succinic chitosan aduvant activity in BSA vaccine are given. It's shown that in 0.25% concentration the preparation manifests aduvant value not worse than that of GOA and oil aduvants. The ability of Chitosan as aduvant in vaccines is supposed.

Введение

Сорбционные свойства хитозана известны достаточно давно. Многие области применения этот полимер завоевал именно благодаря сочетанию свойств: безвредности, биодеструкции и сорбционной активности [1]. В отделе получения БАВ ВНИТИБП на протяжении последнего десятилетия проведены исследования по определению сорбционной активности хитозана с различными физико-химическими показателями, такими, как размер частиц, влажность, молекулярная масса, степень деацетилирования, степень кристалличности, степень замещения аминогрупп. До настоящего времени применение хитозана в качестве адьюванта сдерживалось отсутствием водорастворимых форм.

Стимулирующее влияние адьювантов на иммуногенез связано не со сложностью строения того или иного химического соединения или вещества, а с его физическим или физико-химическим состоянием, способностью изменять физико-химическое состояние антигена (сорбция, эмульгирование), а также характер и выраженность ответной реакции организма на введение адьюванта [4].

Иммунологическая активность сорбированных антигенов обусловлена всем комплексом проявлений, лежащих в основе механизма действия адьювантов: корпускулирование антигена вследствие поглощения его частицами сорбента, клеточно-воспалительная и плазмодитарная реакция, усиление синтеза белка, депонирование антигена и действие его по принципу суммации [3].

Материалы и методы

Хитозан со среднеязкостной молекулярной массой 210 кДа (молекулярно-массовое распределение 156–233 кДа) и степенью деацетилирования 75–92% готовили из различного хитинсодержащего сырья по технологии, разработанной в отделе получения БАВ ВНИТИБП, позволяющей выделять продукт с содержанием белка не более 0,35% и золы не более 0,2%.

Анализ молекулярно-массового распределения этих образцов показал отсутствие низкомолекулярных фракций и высокомолекулярных полимерных структур.

Натриевую соль сукцината хитозана получали путем гетерогенного синтеза с янтарным ангидридом по разработанному нами способу [2]. Концентрат натрие-

вой соли сукцината хитозана после фильтрации высушивали методом сублимационной сушки.

В работе по определению адъювантных свойств использовали 2%-ный раствор сукцината хитозана в забуференном физиологическом растворе (0,01 М калий-фосфатный буфер, содержащий 0,15 М NaCl, pH 7,3 – ЗФР).

Раствор бычьего сывороточного альбумина (БСА) готовили из коммерческого препарата (Sigma, США) путем растворения в ЗФР, pH 7,3. Раствор осветляли низкоскоростным центрифугированием, определяли общий белок по методу Лоури и довели конечную концентрацию до 5 мг/мл.

В качестве адъювантов для сравнения использовали 6%-ную гидроокись алюминия (ГОА), масляный адъювант-ПЭС с эмульгатором № 139 и неполный адъювант Фрейнда.

В опытах использовали белых лабораторных мышей массой 20–25 г по 20 животных в каждой группе, включая контрольную. Иммунизацию проводили по следующей схеме:

первая инъекция – 100 мкл подкожно, вторая инъекция – через 21 день 100 мкл подкожно. Через 21 день после первой и после второй инъекции отбирали по 200 мкл крови и получали сыворотки по стандартной методике.

Уровни антител к БСА в сыворотках крови мышей определяли в непрямом твердофазном ИФА и рассчитывали по формуле $УА = (ОП_{образца} - ОП_{отриц.контроля}) / (ОП_{положит. контроля} - ОП_{отрицательного контроля}) \cdot 100$ и выражали в международных единицах.

Результаты

Препараты БСА с различными адъювантами готовили по прописям обозначенным в табл. 1.

Таблица 1. Состав растворов для инъекций

№ п/п	Адъювант	Конечная концентрация адъюванта, %	Конечная концентрация БСА, мг/мл
1	Без адъюванта	0	1
2	Неполный адъювант Фрейнда	50	1
3	ПЭС	50	1
4	Гидроокись алюминия	1,5	1
5	Сукцинат хитозана	0,25	1

Приготовленные препараты вводились мышам двукратно в объеме 100 мкл (100 мкг БСА на животное) подкожно с интервалом в 21 день. Сыворотки исследовали на наличие антител к БСА. Для этого сорбировали в лунки полистироловых микропланшет для иммунологических исследований по 100 мкл раствора БСА в концентрации 20 мкг/мл в течение ночи при 4–8°C. После стандартной процедуры отмывки и инкубации с исследуемыми и стандартными сыворотками в разведении 1:100 микропланшеты инкубировали с иммунопероксидазным конъюгатом к (L + H-цепям) IgG мыши (Sigma, США). После часовой инкубации и отмывки комплекс БСА – анти-БСА – конъюгат проявляли однокомпонентным, готовым к использованию, стабилизированным раствором 3,3',5,5'-тетраметилбензидина гидрохлорида (ТМБ), содержащим перекись водорода, и измеряли оптическую плотность субстратной смеси при длине волны 450 нм. Как видно из данных табл. 2, наибольшие средние уровни антител к БСА были получены при введении мышам альбумина с сукцинатом хитозана как после первого, так и после второго введения препарата.

В сыворотке животных, которым вводили БСА без адъюванта и с хитозаном, отмечается незначительный разброс уровней антител. В группах мышей, которым вводили препараты с ГОА, масляным адъювантом-ПЭС и неполным адъювантом Фрейнда, наблюдался очень большой разброс уровней антител, что отрицательно сказывалось на общей напряженности гуморального иммунитета в группе.

Таблица 2. Определение уровня антител к БСА в сыворотках мышей В ИФА при использовании различных адъювантов

№ п/п	Адъювант	Средние значения уровня антител к БСА в МЕ через 21 день после 1-й инъекции	Средние значения уровня антител к БСА в МЕ через 21 день после 2-й инъекции
1	Без адъюванта	11,2±3,2	27,6±5,7
2	Неполный адъювант Фрейнда	21,3±18,1	42,5±28,3
3	ПЭС	22,4±19,6	44,4±24,6
4	Гидроокись алюминия	28,7±21,1	50,8±34,4
5	Сукцинат хитозана	45,1±4,0	87,3±6,2

Недостатком гидроокиси алюминия и масляных адъювантов является также ярко выраженная местная воспалительная реакция, переходящая зачастую в процесс инкапсулирования и изъязвления введенного препарата, что привело к отсутствию ожидаемого эффекта.

Полученные результаты демонстрируют, что применение сукцината хитозана в качестве адъюванта позволяет получать иммунный ответ на вводимые антигены на уровне или выше известных масляных и сорбционных адъювантов, что свидетельствует о перспективности дальнейших исследований в этом направлении. Проявленные свойства сукцината хитозана позволяют предложить этот препарат в качестве адъюванта в производстве вакцинных препаратов.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Феофилова Е.П.* Биологические функции и практическое использование хитина // Прикладная биохимия и микробиология. 1984. Т. 20. № 2. С. 147-160.
2. *Патент РФ.* №2144040 "Способ получения натриевой соли сукцината хитозана", 2000. С. 16.
3. *Воробьев А.А., Васильев Н.Н.* Адъюванты. М., 1969. 205 с.
4. *Berlin B.S.* // Immunol. 1990. V. 85. № 1. P. 81.