

Київський національний університет імені Тараса Шевченка
Міністерство освіти і науки України
Інститут біохімії ім. О.В. Палладіна
Національна академія наук України
Київський національний університет імені Тараса Шевченка
Міністерство освіти і науки України

Кваліфікаційна наукова
праця на правах рукопису

КУКЛІНА ТЕТЯНА ОЛЕКСАНДРІВНА

УДК 612.017.12:615.375: 616-097:57.021

ДИСЕРТАЦІЯ

**ІМУНОГЕННІ ВЛАСТИВОСТІ ІММОБІЛІЗОВАНОГО НА МІКРО- ТА
НАНОЧАСТКАХ ДИФТЕРІЙНОГО ТОКСОЇДУ ЗА УМОВ ПЕРОРАЛЬНОЇ
ІМУНІЗАЦІЇ**

03.00.09 – імунологія

Подається на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей,
результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело

_____ Кукліна Т.О.

Науковий керівник Колибо Денис Володимирович доктор біологічних наук,
професор.

Київ – 2019

АНОТАЦІЯ

Кукліна Т.О. Імуногенні властивості іммобілізованого на мікро- та наночастках дифтерійного токсоїду за умов пероральної імунізації. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук (доктора філософії) за спеціальністю 03.00.09 – імунологія. – ННЦ «Інститут біології та медицини», Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ, 2018.

Дисертаційна робота присвячена дослідженню та порівнянню імуногенних та імуноадювантних властивостей комплексів часток різного походження з іммобілізованим дифтерійним токсоїдом при їхньому пероральному введенні, та пошуку можливих підходів їхньої функціоналізації для підвищення індукції специфічного захисного імунітету до введеного антигену.

В роботі, зокрема, було досліджено частки різного розміру та хімічної природи синтезованих на основі золота (Gold), фосфату кальцію (CaP) та полі(D,L-лактид-ко-гліколіду) (PLGA) з іммобілізованим рекомбінантним фрагментом дифтерійного токсоїду та визначено, що кон'югати на основі PLGA продемонстрували найкращі результати за здатністю до взаємодії з антиген-презентувальними клітинами, їхнім цитотоксичним впливом та імуногенними властивостями. Проведено детальні характеристики отриманих комплексів часток. Також показано, що функціоналізація часток на основі PLGA хітозаном підвищує індукцію гуморальної ланки імунної відповіді до цільового антигену - дифтерійного токсоїду. Нами було продемонстровано ефективність запропонованого підходу для пероральної імунізації дифтерійним токсоїдом, який також може бути взятий за основу для створення засобів індукції захисного імунітету слизових оболонок проти інших антигенів.

Ключові слова: пероральна вакцинація, слизові оболонки, ад'юванти, гуморальний імунітет, дифтерійний токсод, наночастки, полі(D,L-лактид-ко-гліколід), золото, фосфат кальцію.

SUMMARY

Kuklina T.O. Immunological properties of diphtherial toxoid immobilized on micro- and nanoparticles upon peroral immunization. – Qualification scientific work on the rights of manuscripts.

The thesis for candidate of biological sciences degree in major 03.00.09 – immunology. – Taras Shevchenko National University of Kyiv, Ministry of Education and Science of Ukraine, Kyiv, 2018.

The immunity of the mucosa protects epithelium from invasion and colonization with pathogenic microorganisms. Mucosa cells also take part in the engulfment and processing of food- air- derived antigens and also antigens from gut microbiota. Due to the permanent and massive antigenic loads with diverse antigens, mucosal immunity is always in active state. Investigation of the different aspects of the immune response development in mucosa will open new strategies for its defense in the future. For that reason, one of the targets of scientific community is to develop and optimize oral vaccination strategies against different pathogens. In this research we investigated and compared immunogenic and immunoadjuvant properties of the particles of different nature that bear immobilized diphtheria toxoid upon peroral immunization. We have also investigated possible approaches for the functionalization of particles-toxoid complexes for the increase induction of adaptive immunity. We choose diphtheria toxoid because of its active secretion in the site of invasion and colonization of bacteria, and induction of potent immune response in this case can be used for effective elimination of the infection.

We investigated a number of different particles of different nature and size that has been conjugated with diphtheria toxoid and determined that those based on

poly(D,L-lactic-co-glycolic)acid were the most effective in respect for the interaction with antigen-presenting cells, cytotoxicity and immunogenicity. We have also shown that functionalization of PLGA-based particles with chitosan increased the induction of adaptive immunity against diphtheria toxoid. Overall, we have shown the efficiency of the suggested approach for peroral immunization with diphtheria toxoid. This approach can also be taken as the reference point for the creation of similar strategies for the induction of adaptive immunity in mucosa against other antigens.

Keywords: oral vaccination, mucosal membrane, adjuvants, humoral immunity, diphtherial toxoid, nanoparticles, poly(D,L-lactic-co-glycolic)acid, colloidal gold, calcium phosphate.

Список публікацій здобувача за темою дисертації

1. **Chudina T.O.**, Labyntsev A.Y., Manoilov K.Y., Kolybo D.V., Komisarenko S.V. Cellobiose-coated poly(lactide-co-glycolide) particles loaded with diphtheria toxoid for per os immunization. *Croat Med J.* 2015, 56(2): 85-93.
2. **Chudina T.O.**, Skoryk M.A. Synthesis and characterization of diphtheria toxoid loaded Poly(D,L-lactic-co-glycolic)acid microparticles. *Biotech. Acta.* 2018, 11(2): 35-41.
3. **Chudina T.O.**, Labyntsev A.Y., Kolybo D.V., Komisarenko S.V. Adjuvant properties of nanoparticles of different chemical structure immobilized with recombinant diphtheria toxoid. *Biotech. Acta.* 2017, 10(4): 14-24.
4. **Chudina T.O.**, Galkin O.V., Siromolot A.A., Oliynyk O.S. Increasing the efficiency of the expression of recombinant scFv-antibodies. *Biotech. Acta.* 2017, 10(5): 19-29.
5. **Chudina T.O.**, Labyntsev A.Y., Romaniuk S.I., Kolybo D.V., Komisarenko S.V. Changes of proHB-EGF expression after functional activation of the immune system cells. *Ukr. Biochem. J.* 2017, 89(6): 33-40.
6. **Чудіна Т.О.** Ад'ювантні властивості наночасток різного розміру та хімічної будови з іммобілізованим рекомбінантним фрагментом дифтерійного токсину при імунізації per os. / Криніна О.І, Манойлов К.Ю., Короткевич Н.В., Лабинцев А.Ю. // Конференції-конкурсу молодих вчених “Актуальні проблеми біохімії та біотехнології–2014”, 29-30 травня, 2014р.: матер. конфер. – м. Київ, 2014. – С. 222.
7. **Chudina T.O.** Importance of dosage and immunization schedule on the adjuvancity of poly(lactide-co-glycolide) particles as antigen carriers for immunization per os. / Labyntsev A.J., Kolybo D.V., Komisarenko S.V. // RECOOP Abstracts for the Croatian Medical Journal, Bridges in Life Science 10th Annual Conference, 16-19 April, 2015: матер. конфер. – Wroslaw, Poland, 2015 P. 31.

8. **Chudina T.O.** Characteristics of PLGA particles for per os immunization / Manoilov K.Y, Labyntsev A.J. // XI Міжнародна наукова конференція студентів і аспірантів «Молодь і поступ біології», 20-23 квітня, 2015: матер. конфер. – м. Львів, 2015 С. 556
9. **Chudina T.O.** Physic-chemical properties of two types of antigen-loaded PLGA carriers for oral immunization // II International Scientific Conference, “Microbiology and Immunology – the development outlook in the 21st century”, 14-15 April, 2016: матер. конфер. – Kyiv, 2016 P.119;
10. **Chudina T.O.** Current strategies for mucosal immunization / Kolybo D.V., Labyntsev A.J. // II International Scientific Conference, “Microbiology and Immunology – the development outlook in the 21st century”, 14-15 April, 2016: матер. конфер. – Kyiv, 2016 P.114;
11. **Chudina T.O.** Physicochemical properties of two types of antigen-loaded PLGA carriers for oral immunization / Kolybo D.V. // X Parnas Conference Young science Forum “Molecules in the Living Cell and Innovative Medicine”, 10–12 July, 2016: матер. конфер. – Wroclaw, Poland, 2016 P. 65.;
12. **Chudina T.O.** Characteristics of PLGA particles for per os immunization // XII Міжнародна наукова конференція студентів і аспірантів «Молодь і поступ біології», 2016: матер. конфер. – м. Львів, 2016 с. 254-5
13. **Chudina T.O.** Physic-chemical characterization of PLGA adjuvants for immunization per os / Kolybo D.V. // FEBS YSF (Young Scientists Forum) and Congress, 2016 матер. конфер. – Kuşadası, Turkey, 2016 P. 146.

2.2.1. Експресія рекомбінантних антигенів в прокариотичній системі експресії <i>E.coli</i>	44
2.2.2. Виділення та очищення рекомбінантних протеїнів методом метал-афінної хроматографії	45
2.2.3. Методи отримання часток різного розміру та хімічної природи. .	46
2.2.4. Покриття часток на основі полі(D,L лактид-ко-гліколіду) хітозаном.....	50
2.2.5. Оцінка ефективності навантаження антигеном	50
2.2.6. Дослідження морфології отриманих часток.....	51
2.2.7. Дослідження розподілу отриманих часток за розміром методом лазерної кореляційної спектроскопії	52
2.2.8. Дослідження розподілу отриманих часток за розміром методом аналізу траєкторії часток.....	52
2.2.9. Визначення швидкості вивільнення протеїнів з часток	53
2.2.10. Культивування еукаріотичних клітин в умовах <i>in vitro</i>	53
2.2.11. Визначення життєздатності клітин з використанням МТТ тесту.	53
2.2.12. Визначення шляху загибелі клітин з використанням Анексину V та етидію броміду.....	55
2.2.13. Аналіз ефективності фагоцитозу отриманих часток методом протокової цитометрії	55
2.2.14. Мічення часток флуоресцентною міткою FITC.....	56
2.2.15. Аналіз ефективності фагоцитозу отриманих часток методом конфокальної мікроскопії.	57
2.2.16. Імунізація мишей отриманими кон'югатами часток з антигеном та забір проб крові	58
2.2.17. Визначення рівня антитіл до досліджуваного антигену в сироватці крові імунізованих мишей.....	58
2.2.18. Статистична обробка отриманих результатів	60
РОЗДІЛ 3	61
ХАРАКТЕРИСТИКА ФІЗИЧНИХ, МОРФОЛОГІЧНИХ, ЦИТОТОКСИЧНИХ ТА АД'ЮВАНТНИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ ЧАСТОК	

РІЗНОГО ПОХОДЖЕННЯ З ІММОБІЛІЗОВАНИМ ФРАГМЕНТОМ ДИФТЕРІЙНОГО ТОКСОЇДУ	61
3.1 Отримання рекомбінантного антигену.....	61
3.2 Характеристика комплексів часток різної хімічної природи та розміру з іммобілізованим рекомбінантним похідним субодиноці В дифтерійного токсоїду.	62
3.2.1 Визначення ефективності навантаження часток рекомбінантним похідним субодиноці В дифтерійного токсоїду	63
3.2.2 Характеристика морфології отриманих часток різної хімічної природи та розміру	65
3.3 Дослідження цитотоксичних властивостей одержаних часток різної хімічної природи <i>in vitro</i>	67
3.3.1 Визначення концентрацій напівмаксимального інгібування (IC_{50}) для часток з встановленим цитотоксичним ефектом.	71
3.3.2 Визначення шляху загибелі клітин ліній L929 та U937 при дії токсичних доз часток Gold 1, Gold 2, CaP	73
3.4 Дослідження процесів взаємодії одержаних часток різної хімічної природи та розміру з антиген-презентувальними клітинами <i>in vitro</i>	76
3.4.1 Дослідження ефективності взаємодії одержаних часток різної хімічної природи з клітинами лінії J774 методом протокової цитометрії.	76
3.4.2 Дослідження динаміки поглинання клітинами лінії J774 одержаних часток різної хімічної природи методом протокової цитометрії	78
3.4.3 Дослідження ефективності взаємодії одержаних часток різної хімічної природи з клітинами лінії J774 методом конфокальної мікроскопії.	80
3.5 Дослідження імуногенних властивостей одержаних часток різної хімічної природи та розміру <i>in vivo</i>	82
3.6 Висновки до розділу.....	87
РОЗДІЛ 4	90
ХАРАКТЕРИСТИКА ЧАСТОК НА ОСНОВІ ПОЛІ(D,L-ЛАКТИД-КО- ГЛІКОЛІДУ) З ІММОБІЛІЗОВАНИМ ФРАГМЕНТОМ ДИФТЕРІЙНОГО ТОКСОЇДУ.....	90

4.1	Характеристика часток на основі полі(D,L-лактид-ко-гліколіду) з іммобілізованим фрагментом дифтерійного токсоду	90
4.1.1	Визначення ефективності навантаження модифікованих часток на основі полі(D,L-лактид-ко-гліколіду) рекомбінантним похідним субодиниці В дифтерійного токсоду	91
4.1.2	Характеристика розмірів PLGA часток, синтезованих за різними методиками	93
4.1.3	Характеристика морфології PLGA часток, синтезованих за різними методиками	95
4.1.4	Порівняння PLGA часток після модифікації схем синтезу	96
4.1.5	Характеристика швидкості вивільнення антигену з PLGA часток, синтезованих за різними методиками, та визначення впливу рН середовища на процеси вивільнення антигену	97
4.2	Оцінка ефективності прояву імуногенних властивостей кон'югованого з частками PLGA антигену в залежності від дози введення	98
4.2.1	Визначення титрів антитіл класу G у сироватці крові тварин, імунізованих різними дозами антигену, іммобілізованого на частках PLGA.	100
4.2.2	Визначення титрів антитіл класу A у сироватці крові тварин імунізованих різними дозами антигену, іммобілізованого на частках PLGA.	103
4.3	Висновки до розділу.....	107
РОЗДІЛ 5		110
ФУНКЦІОНАЛІЗАЦІЯ ЧАСТОК НА ОСНОВІ ПОЛІ(D,L-ЛАКТИД-КО-ГЛІКОЛІДУ) З ІММОБІЛІЗОВАНИМ ФРАГМЕНТОМ ДИФТЕРІЙНОГО ТОКСОЇДУ.....		110
5.1	Навантаження часток PLGA 2* ад'ювантними молекулами убіквітину або стафілококового протеїну А.....	110
5.2	Покриття часток PLGA 2* захисним шаром на основі хітозану	112
5.3	Визначення перспективних ад'ювантних молекул для функціоналізації часток.....	114
5.3.1	Дослідження змін в експресії ргоHB-EGF, як цільової молекули для зв'язування з ДТ	115

5.3.2 Отримання рекомбінантних scFv-антитіл злитих із фрагментом SpA	119
5.4 Висновки до розділу.....	123
АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ ОТРИМАНИХ РЕЗУЛЬТАТІВ.....	125
ВИСНОВКИ.....	136
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	138

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

CaP – наночастки фосфату кальцію;

CD (від англ. cluster of differentiation) – кластер диференціації;

CS (від англ. chitosan) – хітозан;

CRM197 – нетоксичний мутант дифтерійного токсину;

EDTA (від англ. Ethylenediaminetetraacetic acid) – етилендіамінтетраоцетова кислота;

EGFP (від англ. Enhanced Green Fluorescent Protein) – підсилений зелений флуоресцентний протеїн;

EtBr – етидій бромід;

FITC (від англ. Fluorescein isothiocyanate) – флуоресцеїнізотіоціанат;

Gold – наночастки золота;

HB-EGF (від англ. HeparinBinding Epidermal growth factor-like Growth Factor) – гепаринзв'язувальний фактор росту, що подібний до епідермального фактору росту;

HEPES – 4-(2-гідроксиетил)-1-піперазинетансульфонова кислота;

IC50 – напівлетальна доза;

IgA – імуноглобуліни класу А;

IgG – імуноглобулін класу G;

IPTG (від англ. Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside) – ізопропіл- β -D-тіогалактопіранозид;

MALT (від англ. mucosa-associated lymphoid tissue) – лімфоїдна тканина, асоційована зі слизовими;

mCh – (mCherry) червоний флуорисцентний протеїн;

NTA (від англ. Nanoparticle Tracking Analysis) – аналіз траєкторії часток;

PLGA – наночастки полі(D,L-лактид-ко-гліколіду);

PVA (від англ. Poly(vinyl alcohol) – полівініловий спирт;

proHB-EGF – трансмембранна форма HB-EGF;

rsHB-EGF – розчинна форма HB-EGF;

scFv (від англ. Single-chain variable fragment) – одноланцюгові варіабельні фрагменти антитіл;

SIgA – антиген-специфічні секреторні антитіла класу А;

sIgA – секреторний імуноглобулін А;

SpA (від англ. *Staphylococcus aureus* protein A) – стафілококовий протеїн А);

SubВ – субодиниця В дифтерійного токсину;

Ubq – убіквітин;

БСА – сироватковий альбумін бика;

ДК – дендритні клітини;

ДНК – дезоксирибонуклеїнова кислота;

ДСН-ПААГ - електрофорез в поліакриламідному гелі з додецилсульфатом натрія;

ДТ – дифтерійний токсин;

ІЕА – імуноензимний аналіз;

ЛКС – лазерна кореляційна спектроскопія;

ЛПС – ліпополісахариди;

МНС II – молекулярний комплекс гістосумісності 2-го типу;

МТТ – 3-(4,5-діметилтіазоліл-2)-2,5-діфенілтетразоліум бромід;

ПААГ – поліакриламідний гель;

РАМР – патогенасоційовані молекулярні патерни;

СЕМ – скануюча електронна мікроскопія;

Тх – хелперні Т-клітини;

ФАЕ – фолікуло-асоційований епітелій;

ФБР – фосфатний буферний розчин;

ШКТ – шлунково-кишковий тракт.

ВСТУП

Актуальність теми. Імунна система слизових оболонок виконує функцію захисту від вторгнення і колонізації епітелію потенційно небезпечними мікроорганізмами. Також в слизових оболонках відбувається поглинання та процесинг антигенів, у тому числі чужорідних протеїнів, отриманих з їжі, повітря або власної мікрофлори [1]. У зв'язку з постійним, і досить різноманітним, антигенним навантаженням слизових, імунна система в них знаходиться в активному стані постійно.

Імунна відповідь у слизових оболонках реалізується у спеціалізованих лімфоїдних структурах MALT (від англ. mucosa-associated lymphoid tissue) [2]. Саме в них знаходяться імунні клітини, які захищають слизові оболонки від потрапляння чужорідних антигенів всередину організму. Посилюється бар'єр слизових за допомогою утворення специфічних секреторних IgA (SIgA) антитіл, що запобігає проникненню патогенів і токсинів до організму [3].

Поглиблення знань щодо особливостей розвитку імунної відповіді у слизових відкриває нові можливості для розробки засобів їхнього захисту. Саме тому зростає зацікавленість щодо методів вакцинації через слизові проти різних патогенних мікроорганізмів.

Ін'єкційна вакцинація сприяє індукції системного захисного імунітету, але не націлена на забезпечення імунного захисту слизових оболонок, які є першою лінією захисту проти більшості патогенних мікроорганізмів[4]. Перевагою вакцинації через слизові є те, що вони можуть викликати активацію гуморального та клітинного імунітету, як місцево, так і системно.

Вакцинація через слизові оболонки є загальним перспективним підходом щодо боротьби з хворобами, викликаними дією патогенних мікроорганізмів. Пояснюється це відносною безпечністю і значними профілактичними та терапевтичними ефектами такого способу вакцинації [5].

Серед різноманіття шляхів вакцинації через слизові оболонки, доставка *per os* є найбільш поширеним методом введення препаратів. Пероральна вакцинація має ряд переваг в порівнянні із традиційними методами вакцинації, заснованими на введенні вакцини у формі ін'єкцій: 1) багато інфекційних та паразитичних агентів проникають в організм через слизову кишечника і наявність специфічного місцевого імунітету дозволить максимально ефективно та безпечно для організму попереджувати проникнення патогену; 2) застосування пероральної вакцини не вимагає інвазивного втручання, а, отже, ризик ускладнень для пацієнтів значно знижується; 3) вимоги до стерильності та чистоти пероральних вакцин є менш строгими, ніж до вакцин, які вводяться у вигляді ін'єкцій, що відповідно позначається на вартості виробництва; 4) при пероральній вакцинації розвивається переважно гуморальний імунітет і не розвивається запальна реакція; 5) пероральна вакцинація може використовуватись не лише для профілактики інфекцій, але й для лікування ряду патологічних станів.

Незважаючи на переваги пероральної доставки, суворі умови шлунково-кишкового тракту (ШКТ) створюють певні складнощі використання цього методу. Погана проникність мембран, ензиматичне розщеплення протеїнових препаратів, і, особливо, здатність імунної системи слизових оболонок до толерантності, яка захищає від небажаної імунної активності до компонентів їжі, залишаються невирішеними проблемами [6, 7]. Саме тому, при розробці вакцин для слизових оболонок найбільш важливими завданнями є вибір способу доставки антигену, захист антигенного матеріалу від дії пошкоджуючих факторів внутрішнього середовища організму та вибір безпечних ад'ювантів для підсилення імунної відповіді в слизових.

Серед різних стратегій, нанотехнологія надала нові можливості для пероральної доставки протеїнових препаратів[7]. Завдяки своїм унікальним властивостям і розмірам наночастки можуть проникати через бар'єр слизових оболонок і переносити іммобілізований з ними антиген у внутрішнє

середовище організму, захищати протеїн від дії пошкоджуючих факторів ШКТ, а також чинити імуномодулюючі та імуностимулюючі ефекти, підсилюючи імуногенність антигену.

У ролі носіїв для антигена користуються різноманітними наночастками, створеними на основі полімерів, металів, ліпідів, ліпополісахаридів тощо [3,8]. Проте ад'ювантні та фізико-хімічні властивості усіх цих носіїв досить різні, і тому їхня взаємодія з антигеном і поведінка у ШКТ теж може відрізнятись. Саме тому, для досягнення якомога ефективніших результатів потрібно порівняти здатність викликати імунну відповідь певного антигену, кон'югованого з наночастками різного походження.

Щільність посадки протеїнових антигенів, розмір часток, а також швидкість вивільнення антигену можуть бути важливими фізичними критеріями, за якими імунна система зможе визначати належність тих чи інших наночасток до „чужорідних” структур. Взаємодія таких комплексів з клітинами імунної системи, а також з М-клітинами слизових оболонок є досить вагомим фактором для індукції захисного імунітету.

Головним фактором патогенності збудника дифтерії є дифтерійний токсин, який продукується бактерією в місцях колонізації на слизових оболонках. Отже індукція потужного антитоксичного імунітету в слизових потенційно здатна захистити організм від інфекції. Саме тому вибір рекомбінантного фрагменту дифтерійного токсоїду, як антигену для дослідження ефективності вакцинації через слизові оболонки є перспективним та практичним підходом.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертаційна робота виконана на базі ННЦ «Інститут біології та медицини» на кафедрі мікробіології та імунології в рамках бюджетної теми «Механізми регуляції метаболічних процесів в організмі за умов розвитку патологічних станів» (№ д/р 0116U002527, 2016-2018 рр.) та Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України в рамках виконання НДР в рамках відомчої

тематики «Вивчення структури і функцій протеїнів і пептидів та їх використання для біомедицини» (№ д/р 0114U003216, 2014-2018 рр.) та НДР в рамках Гранту Президента України докторам наук для здійснення наукових досліджень «Імуногенні властивості навантажених антигеном носіїв на основі полі(D,L-лактид-ко-гліколіду) для пероральної імунізації» (№ д/р 0117U007210, 2017 р.). Тема дисертаційної роботи затверджена на засіданні Вченої ради ННЦ «Інститут біології» Київського національного університету імені Тараса Шевченка, протокол № 8 від 23 березня 2015 року. Уточнену редакцію теми дисертаційного дослідження затверджено на засіданні Вченої ради ННЦ «Інститут біології та медицини» Київського національного університету імені Тараса Шевченка, протокол № 8 від 13 лютого 2017 року.

Мета і завдання дослідження. Метою роботи було дослідити здатність дифтерійного токсоїду, іммобілізованого на частках різного розміру та хімічної природи, індукувати антитілоутворення при введенні *per os*.

Для досягнення мети були поставлені наступні завдання:

1. Синтезувати частки різного розміру та хімічної природи, отримати їхні кон'югати з іммобілізованим рекомбінантним фрагментом дифтерійного токсоїду та визначити основні фізико-хімічні характеристики комплексів часток з іммобілізованим антигеном.
2. Дослідити цитотоксичні властивості отриманих композитів наночасток та їхню взаємодію з антиген-презентувальними клітинами *in vitro*.
3. Дослідити динаміку розвитку гуморальної ланки імунної відповіді при пероральній імунізації комплексами наночасток з рекомбінантним фрагментом дифтерійного токсоїду.
4. Оптимізувати композити на основі наночасток для пероральної імунізації, дослідити ефективність використання хітозану для формування захисного шару.

Об'єкт дослідження: рекомбінантний фрагмент дифтерійного токсоїду, іммобілізований на частках різного розміру та хімічної будови.

Предмет дослідження: індукція антитілоутворення за дії рекомбіного фрагмента дифтерійного токсоїду, іммобілізованого на частках різного розміру та хімічної природи.

Методи дослідження: для виконання поставлених завдань було використано імунологічні (імунізація тварин, ІЕА, фагоцитарний тест, протокова цитометрія), біохімічні (гель-електрофорез для розділення протеїнів та ДНК, метал-афінна хроматографія для очищення протеїнових препаратів), молекулярно-біологічні (отримання рекомбінантних протеїнів), мікробіологічні (культивування мікроорганізмів з метою нарощування біомаси для виділення рекомбінантних протеїнів), оптичні (електронна мікроскопія, спектрофотометрія, протокова цитометрія, конфокальна мікроскопія), хімічні методи (ковалентне мічення протеїнів флуоресцентними мітками, отримання частинок), методи роботи із культурою еукаріот (культивування малігнантних еукаріотичних клітин), обчислювальні (розрахунок концентрацій та молекулярних мас протеїнів та ДНК) і статистичні методи.

Наукова новизна одержаних результатів.

В роботі вперше отримано кон'югати часток золота (Gold), фосфату кальцію (CaP) та полі(D,L лактид-ко-гліколіду) (PLGA) з рекомбінантним фрагментом дифтерійного токсоїду (SubB), та проведено порівняння комплексів часток різного розміру та хімічної будови на предмет їхніх фізико-хімічних властивостей, особливостей взаємодії з антиген-презентувальними клітинами та індукції гуморальної відповіді при введенні їх *per os*.

Вперше було проведено дослідження щодо здатності часток на основі PLGA індукувати та коригувати імунну відповідь на слизових по відношенню до фактора патогенності *Corynebacterium diphtheriae*. Визначено, що в процесі вакцинації через слизові оболонки комплексами

PLGA з рекомбінантним фрагментом дифтерійного токсоїду формується імунологічна пам'ять до введеного антигену шляхом накопичення специфічних антитіл за таким порядком: Ig M \rightarrow Ig G; Ig G \rightarrow Ig A. Було проведено визначення перспективних ад'ювантних молекул для функціоналізації часток на основі PLGA з метою підвищення їхніх антигенних властивостей для індукції захисної імунної відповіді по відношенню до інфекції, спричиненої *C. diphtheriae*.

Особистий внесок здобувача. Спільно з науковим керівником д.б.н., професором Д.В. Колибо розроблено концепцію дисертаційної роботи, поставлено мета та завдання дисертаційного дослідження, проведено планування експерименту та розробка методичних підходів до виконання комплексу лабораторних досліджень, обговорено отримані результати, сформульовано висновки. Автором самостійно були проаналізовані літературні дані стосовно проблематики дисертаційної роботи, проведено інформаційний пошук, аналіз та статистичне опрацювання результатів дослідження. Автором виконано синтез часток різного походження і хімічної будови та проведено їхню кон'югацію з протеїновими препаратами; оптимізовано умови сорбції антигену та підібрано методи функціоналізації часток; досліджено ад'ювантні властивості комплексів часток з антигеном.

Автор щиро вдячний усім співробітникам лабораторії імунобіології відділу молекулярної імунології Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна. Зокрема, інженеру I кат. Криніній О.І. та інженеру I кат. Сіромолоту А.А. за консультації у роботі з хроматографією, м.н.с. Манойлову К.Ю. за консультації у роботі з прокаріотичними клітинами, к.б.н., м.н.с. Короткевич Н.В. за консультацію у роботі з еукаріотичними клітинами, к.б.н., с.н.с. Олійник О.С за участь у роботі з рекомбінантними scFv-антитілами, к.б.н., н.с. Лабинцеву А.Ю. за консультаційну допомогу, роботу з протоковою цитофлуориметрією та конфокальною мікроскопією. Допомогу в проведенні досліджень на електронному мікроскопі надавав завідувач лабораторією електронної мікроскопії ТОВ «НаноМедТех» Скорик М.А.

Практичне значення одержаних результатів. Вивчення та оптимізація ад'ювантних властивостей наночастинок має на меті подальше їхнє використання, як універсальних ад'ювантів при пероральній вакцинації для профілактики та лікування багатьох захворювань. Пероральна вакцинація має ряд переваг в порівнянні із традиційними методами вакцинації, заснованими на введенні вакцини у формі ін'єкцій.

Саме за допомогою наночастинок можна відтворити певні особливості будови вірусних часток і примусити імунну систему реагувати на такі кон'югати, як на відповідних патогенів. В цій дисертаційній роботі шляхом підбору умов синтезу створено композити з модельними антигенами - рекомбінантним фрагментом дифтерійного токсиду, для пероральної вакцинації.

Використання наночастинок для пероральної вакцинації дасть можливість доставити кон'юговані з ними протеїнові антигени до відповідних органів лімфоїдної системи (Пейєрових бляшок кишечника) без значного пошкодження в шлунково-кишковому тракті. Саме застосування підходів для пероральної вакцинації дозволить створити засоби підсилення імунітету слизових і індукції захисних антитіл класу А, що для ряду захворювань, зокрема, для дифтерії, є вирішальним для захисту від інфекції і токсичного ураження.

Одержані дані щодо можливості індукції протективного імунітету слизових в наслідок пероральної імунізації можуть стати основою для створення нових вакцинних препаратів. Враховані вище обставини свідчать про те, що дані дослідження характеризуються актуальністю і обґрунтовують доцільність виконання даного проекту.

Апробація результатів дисертації. Основні результати наукових досліджень неодноразово доповідались на ряді міжнародних та Всеукраїнських наукових конференціях, конкурсах, зокрема: міжнародній конференції «IX Jakub K. Parnas Conference» (Єрусалим, Ізраїль, 2014), конференції-конкурсі молодих вчених “Актуальні проблеми біохімії та

біотехнології–2014” (Київ, Україна, 2014), X міжнародній щорічній конференції «Bridges in Life Science» (Вроцлав, Польща, 2015), XI міжнародній науковій конференції студентів і аспірантів «Молодь і поступ біології» (Львів, Україна, 2015), II-й міжнародній науковій конференції «Мікробіологія та імунологія – перспективи розвитку в XXI сторіччі» (Київ, Україна, 2016), XII міжнародній науковій конференції студентів і аспірантів «Молодь і поступ біології» (Львів, Україна, 2016), : міжнародній конференції «X Jakub K. Parnas Conference» (Вроцлав, Польща, 2015), FEBS YSF (Young Scientists Forum) and Congress, конкурсі стартапів «Фестиваль інновацій 2016» (Київ, Україна, 2016), VI конкурсі стартапів "Sikorsky Challenge 2017" (Київ, Україна, 2017).

Публікації. За матеріалами дисертації опубліковано 13 робіт, з них 5 статей у фахових наукових виданнях (з них 2 – у виданнях, що входять до міжнародної бази даних SCOPUS та усі 5 – у виданнях, що входять до міжнародної бази даних Scopus), 8 тез у матеріалах міжнародних та вітчизняних конгресів і конференцій.

Структура та обсяг дисертації. Дисертаційна робота складається зі вступу, огляду літератури, опису матеріалів та методів дослідження, трьох розділів результатів дослідження та їхнє обговорення, висновків та списку використаних літературних джерел. Робота викладена на 150 сторінках, ілюстрована 6 таблицями та 35 рисунками. Перелік використаних літературних джерел складається зі 128 найменувань, з них кирилицею – 4, латиницею – 124.

РОЗДІЛ 1

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1 Імунна відповідь слизових оболонок

1.1.1 Особливості імунної відповіді слизових оболонок

Імунна система поширює свій вплив на весь організм з метою забезпечення його захисту від патогенів, у яку б його частину вони не потрапляли. У межах імунної системи розрізняють серію анатомічно відмінних компартментів (відділів), специфічно адаптованих для розвитку імунної відповіді на патогени в різних тканинах організму [9]. Функціонально залежна від системних імунних компартментів, імунна система слизових оболонок має свої власні високоорганізовані лімфоїдні тканини [10].

Слизові оболонки, що покривають травний та сечостатевий тракти, а також кон'юнктиву ока, внутрішнє вухо і протоки всіх екзокринних залоз наділені потужними механічними і хімічними механізмами очищення, які знешкоджують і відштовхують більшість сторонніх тіл. Крім того, високоспеціалізована вроджена і адаптивна імунні системи слизових захищають ці поверхні від потенційних атак з навколишнього середовища [1]. У здорової дорослої людини в роботі цієї системи задіяно майже 80% всіх імуноцитів. Ці клітини накопичуються в різноманітних лімфоїдних тканинах, асоційованих зі слизовими (MALT від англ. mucosa-associated lymphoid tissue), або мігрують між ними. Разом вони утворюють найбільшу систему лімфоїдних органів ссавців [11].

Раніше вважали, що надходження антигенів до внутрішнього середовища організму пов'язано виключно з порушенням цілісності бар'єрів. Однак нещодавно було встановлено, що чужорідні молекули та антигени в нормі безперервно поступають в організм через слизові оболонки. Їхній

транспорт здійснюється спеціалізованими М-клітинами, які присутні у складі фолікул-асоційованого епітелію (ФАЕ), котрий встигає внутрішню поверхню слизових оболонок над місцями розміщення лімфоїдних фолікул або Пейєрових бляшок [12].

На відміну від апарату системного імунітету, який у нормі функціонує в стерильних умовах і агресивно реагує на вторгнення з навколишнього середовища, імунна система слизових постійно знаходиться у контакті з різноманітними антигенами їжі, повітря, власної мікрофлори та патогенних мікроорганізмів, і тому відповідь на них повинна бути контрольована задля уникнення імовірності розвитку стану надлишкового запального процесу слизових та імунного виснаження.

З огляду на все сказане імунна система слизових виконує 3 основні функції:

- (i) захищає від колонізації і вторгнення потенційно небезпечних мікроорганізмів, які потрапляють на слизову;
- (ii) запобігає поглинанню недеградованих антигенів, у тому числі чужорідних протеїнів, отриманих з їжі, повітря або власної мікрофлори;
- (iii) запобігає розвитку надмірної імунної відповіді на усі ці антигени за рахунок чого знижується імовірність розвитку стану надлишкового запального процесу слизових та імунного виснаження [1].

1.1.2 Захисні функції слизових оболонок шлунково-кишкового тракту

Шлунково-кишковий тракт адаптувався багатьма різними способами для досягнення гармонійних взаємин з коменсалами. Кишковий бар'єр, утворений моношаром епітеліальних клітин, має ряд спеціалізованих захисних пристосувань, що обмежують проникнення антигенів і мікроорганізмів [14-16].

Епітелій тонкого кишечника складається з шести типів диференційованих епітеліальних клітин, включаючи келихоподібні клітини, клітини Пенета, ентероендокринні клітини, ентероцити та М-клітини [17].

Келихоподібні клітини секретують слиз, який в основному складається з глікопротеїнових муцинів, які формують в'язку гелеподібну плівку на епітеліальній поверхні [18]. Наявність такого бар'єру пояснює дружнє співіснування організму людини з її власною мікрофлорою. Саме муцин допомагає бактеріям існувати в порожнині кишечника, запобігаючи їх адгезії на епітеліальних клітинах. Тому кількість келихоподібних клітин збільшується у товстому кишечнику, що є пристосуванням до більшого числа бактерій у цьому відділі [19].

Клітини Пенета - це спеціалізовані епітеліальні клітини. Вони секретують мікробоцидні дифензини при впливі бактеріальних антигенів [20-21]. В додаток до цього відбувається продукція антибактеріальних продуктів, в тому числі лізоциму та кателіцидинів, що запобігають прямому доступу мікроорганізмів до слизової оболонки кишечника, тим самим виступаючи в якості регуляторів мікробної щільності [14-16].

На відміну від ворсинчастого епітелію, до складу якого входять секреторні типи клітин, такі як клітини Пенета, келихоподібні та ентероендокринні клітини, фолікуло-асоційований епітелій (ФАЕ) Пейєрових бляшок в основному складається з абсорбційних ентероцитів та М-клітин [22]. Склад ФАЕ тісно пов'язаний з відбором антигенів та індукцією антиген-специфічної імунної відповіді [23]. Така відповідальність лягає саме на М-клітини (мікроскладчасті клітини), які і відповідають за ініціацію антиген-специфічної імунної реакції.

Вперше М-клітини були ідентифіковані в апендиксі кролика в 1965 році і спочатку називалися лімфоепітеліальні клітини. Пізніше вони були перейменовані на мікроскладчасті клітини (М-клітини) завдяки спостереженню "мікроскладчастої" структури на апікальній поверхні цих клітин у людини [24]. Морфологічні особливості М-клітин дозволяють

відрізнати їх від ентероцитів за їхньою апікальною поверхнею, яка у М-клітин виглядає неначе заглибленою за рахунок рідких та коротких ворсинок на їхній поверхні [17, 25]. Поряд із цією відмінністю, М-клітини вкриті тонким шаром глікокаліксу, що робить їх привабливою мішенню для проникнення антигенів та прикріплення бактерій [26]. Базальна частина М-клітин теж має свої особливості. Завдяки наявності своєї кишені ці клітини тісно пов'язані з індукцією імунної відповіді на слизових через взаємодію з деякими клітинами імунної системи, включаючи В-клітини, Т-клітини, макрофаги та дендритні клітини, які локалізуються поблизу [17, 26].

1.1.3 Імунна система слизових оболонок шлунково-кишкового тракту

У ссавців добре розвинуті високоорганізовані вторинні лімфоїдні тканини у ШКТ, що полегшує поглинання антигену, його обробку та презентацію для індукції імунної реакції на слизових оболонках [10]. Більшість зовнішніх поверхонь слизових оболонок наповнені, організованими фолікулами і розсіяними лімфоїдними структурами, які включають В-клітини, Т-лімфоцити, Т-клітинні підмножини, плазматичні клітини, а також ряд інших клітинних елементів, що беруть участь в індукції і підтриманні імунної відповіді слизових оболонок [27]. Це найкраще ілюструється на прикладі Пейєрових бляшок, які є індуктивними сайтами кишечника.

Пейєрові бляшки анатомічно можна умовно розділити на три зони: купол, фолікули, що знаходяться під ним (В-клітинна зона з зародковими центрами), та інтерфолікулярні регіони (Т-клітинні зони). Поверхня області купола вкрита спеціалізованим фолікуло-асоційованим епітелієм, збагаченим М-клітинами, які адаптовані до поглинання та транспорту антигенів з просвіту кишечника [28]. Після успішного поглинання антигенів М-

клітинами, вони відразу опиняються в субепітеліальній кишені, де і відбувається їхня обробка і презентація на дендритних клітинах (ДК).

ДК є спеціалізованими антиген-презентуючими клітинами, які зустрічаються в різних ділянках організму, де вони інтерналізують та процесують антигени [29]. У слизових, вони знаходяться у субепітеліальному просторі, переважно в Т-клітинній зоні лімфоїдної тканини, асоційованої зі слизовою оболонкою [30]. ДК слизових оболонок можуть контролювати супресивну регуляцію бактерій мікрофлори і нешкідливих антигенів, та захищати організм від патогенів [10].

ДК генерують різні хелперні Т-клітини (наприклад, клітини $T_H1/T_H2/T_H17$), $CD8^+$ Т-клітини та індукцію синтезу SIgA антитіл. Серед усієї сукупності дендритних клітин слизових оболонок, $CD103^+$ ДК грають незамінну роль у диференціюванні Т-клітин, в той час, як $CD3CR1^+$ ДК можуть захоплювати та процесувати антигени, як з кровоносної системи, так і з просвіту кишечника [31]. Деякі підкласи ДК здатні до синтезу ретинальдегід дегідрогенази і, таким чином, можуть бути задіяні у перемиканні синтезу IgA.

Через те, що слизові оболонки постійно піддаються впливу екзогенних антигенів, ця тканина має певні адаптивні клітини вродженого імунітету, щоб полегшити імунний нагляд. Мастоцити у слизових відділах (мастоцити слизових оболонок) є ключовими гравцями у контролі над запальними, алергічними та інфекційними захворюваннями. Відомо, що лікування з використанням активаторів, які є специфічними для мастоцитів, призводить до розвитку захисного імунітету проти патогенів на слизових оболонках [32].

Мастоцити слизових оболонок, в основному, виробляють гістамін, протеази (наприклад, триптаза та хімаза) і ФНП (фактор некрозу пухлин). Усі ці речовини можуть відігравати вирішальну роль у захисті слизових оболонок [3]. Крім того, мастоцити слизових оболонок беруть участь в індукції синтезу секреторних IgA через продукцію IL- 6, а також шляхом фізичних взаємодій через CD40 - CD40L. І, навпаки, пригнічення активації

мастоцитів покращує симптоми, пов'язані з алергіями кишечника, патогенною інфекцією та запаленням [33-34].

Після контакту з антигеном і його поглинанням через М-клітини, існує різна ступінь активації Т-клітин, дендритних клітин і В-клітин, особливо IgA ізотипу. Взаємодія лімфоцитів з епітелієм слизової оболонки відіграє важливу роль в диференціації деяких сегментів епітелію слизової оболонки в М-клітини [35].

Захист від багатьох бактеріальних і вірусних інфекцій залежить від ефективної стимуляції ефektorних Т-хелперів 1 (Тх1) клітин, в той час як Тх2 клітини мають непряму роль, підтримуючи вироблення антитіл [2]. Активація Т-клітин призводить до вивільнення ряду окремих цитокінів або хемокінів з різних підмножин Т-клітин і позпізнавання антигенних епітопів, пов'язаних з МНС I або МНС II молекулами. Обидві активації і вивільнення специфічних цитокінів Т-клітинами беруть участь в остаточному процесі активації В-клітин, перемиканні ізотипу та експресії конкретного інтегрину антиген-сенсibiliзованими В-клітинами. Обидва типи Т-хелперів класів 1 та 2 впливають на секрецію SIgA [36]. Цитокіни Тх2 (інтерлейкін-4 (IL-4) IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, і IL-13), як вважається, вносять істотну допомогу в продукцію антитіл [37]. Відповідь SIgA антитіла також посилюється імунологічними ад'ювантами, такими як холерний токсин, який призводить до активації клітинної відповіді Т-хелперів другого класу [38]. Активація синтезу SIgA антитіл також може бути викликана через цитокіни Т-хелперів 1 (IL-2 і гамма-інтерферон (IFN- γ)), що показано в ході досліджень внутрішньоклітинних патогенів, таких як *Salmonella* [37].

Тх17 є ефektorними CD4⁺ Т-клітинами, що визначаються за їхньою продукцією IL-17 і можуть знаходитися у слизових оболонках. Вони можуть бути залучені у захисті проти кількох бактеріальних інфекцій, у тому числі *Helicobacter. pylori*, *Streptococcus pneumoniae*, *Mycobacterium. tuberculosis*, *Klebsiella spp.* and *Bacillus anthracis* [39]. Хоча клітини Тх17 особливо часто ідентифікують у шлунково-кишковій слизовій оболонці в результаті

бактеріальної колонізації, їхня кінцева функція у кишечнику в гомеостазі ще не дуже добре зрозуміла. Проте, відомо, що відповіді спричинені впливом ІЛ-17 мають вирішальне значення для підтримки слизового бар'єру, за рахунок міграції нейтрофілів і звільнення антимікробних пептидів і дефензинів [40-42].

Секреція антитіл є критично важливим процесом імунної відповіді ссавців. Клінічні дані показують, що секреторний імуноглобулін має нейтралізуючу функцію до токсинів та інших розчинних молекул і запобігає адгезії бактерій до епітеліальних клітин. ІgA нейтралізація може також захистити від внутрішньоклітинних вірусних інфекцій епітеліальних клітин.

Основним ізотипом антитіл з зовнішньою секрецією є секреторний імуноглобулін класу А (SIgA). Приблизно 40 мг ІgA на кг ваги тіла секретується щодня, з переважною більшістю у шлунково-кишковому тракті. При цьому загальна кількість синтезованого ІgA майже в два рази перевищує кількість ІgG, що продукуються щодня в організмі людини. Однак, цікаво, що основні ефекторні клітини в слизових оболонках не плазматичні клітини, що секретують ІgA, а Т-лімфоцити CD4+, а також CD8+ фенотипів. Вважається, що Т-лімфоцити можуть становити до 80% від всієї лімфоїдної популяції клітин слизових поверхонь [43].

ІgA+ В-клітини виникають з наївних В-клітин у слизовій лімфоїдній тканині (наступний клас при перемиканні з ІgM до ІgA). Це перемикання класів індукується антигенною стимуляцією і наявністю трансформуючого фактору росту (TGF) і меншою мірою інтерлейкіном-10 (ІЛ-10) та фактором активації В-клітин (BCAF) [35]. Обидва шляхи залежний і незалежний від Т-клітин ведуть до синтезу ІgA. Т-клітинно-залежний шлях має вирішальне значення при вакцинації через слизові оболонки, в той час як шлях незалежний від Т-клітин відіграє важливу роль в гомеостазі слизової оболонки з мікрофлорою [2].

1.2 Вакцинація через слизові оболонки

1.2.1 Основні шляхи імунізації слизових оболонок

На сьогоднішній день вивчаються різноманітні шляхи доставки вакцин до слизових оболонок, для індукції імунної відповіді слизових оболонок, у тому числі пероральні, інтраназальні, інгаляторні, сублінгвальні, інтравагінальні та ректальні маршрути.

Компартменталізація в слизовій імунній системі накладає певні обмеження на вибір маршруту вакцинації для стимулювання ефективних імунних реакцій в потрібних сайтах. Таким чином, у той час як пероральна імунізація може викликати суттєві збільшення синтезу антитіл у тонкому кишечнику (найсильніші в проксимальному сегменті), та молочних і слинних залозах, це відносно неефективно впливає на синтез IgA антитіл в дистальних сегментах товстої кишки, мигдалинах або слизових оболонках жіночих статевих органів [44-46]. З іншого боку, ректальна імунізація викликає сильні місцеві реакції антитіл в прямій кишці, але досить слабо впливає на такі відповіді у тонкому кишечнику [45-47]. Інтраназальна імунізація показує позитивні результати синтезу антитіл у слизових верхніх дихальних шляхів і регіональних виділеннях (слина, виділення з носа), не викликаючи імунну відповідь у ШКТ [48-49]. Іншим визначним результатом, показаним у мишей, є те, що шкірна імунізація може індукувати імунну відповідь слизових оболонок жіночого статевого тракту [50]. Слід також мати на увазі, що менструальний статус жінок може впливати на інтенсивність імунної відповіді в статевих органах [49, 51].

Доставка вакцин через більшість цих маршрутів добре працює в експериментальних моделях на тваринах, але тільки пероральний та інтраназальний способи доставки препарату на сьогодні використовуються для вакцинації людей [52].

Зважаючи на той факт, що ШКТ піддається постійній атаці мікроорганізмами, які складають мікрофлору, або ж патогенами що потрапляють ззовні, захист слизових оболонок у цьому відділі має особливе значення.

1.2.2 Пероральна імунізація слизових оболонок

Пероральний шлях введення найбільш часто використовується для доставки лікарських препаратів [53]. Протягом майже століття багато досліджень були зосереджені на розробці пероральних вакцин, як маршрутів імунізації проти кишкових патогенів. Це має вирішальне значення в успішній індукції імунної відповіді у слизових відділах, які слугують вхідними воротами для багатьох інфекцій [2]. На додаток до переваг цих вакцин, використання слизових маршрутів їхнього введення, особливо пероральний шлях, може підвищити економічну цінність вакцини і зробити вакцинування більш безпечним і легким, не потребуючи задіяння медичного персоналу [54].

Що ще більш важливо, вакцинація через слизові може викликати імунну відповідь, як системно, так і на слизових поверхнях, яка слабо задіяна при парентеральній імунізації [55]. Слизовий епітелій, що вкриває травний тракт являє собою особливий відділ імунної системи, який підтримує гомеостаз у слизових оболонках шляхом обмеження припливу перетравлюваних антигенів і переважно викликаючи толерантність до них [56]. Враховуючи, що 90% інфікувань відбувається через слизові, можна припустити, що використання вакцинації через слизові оболонки буде найкращим засобом для створенню протиінфекційного імунітету у цих відділах [57]

Тим не менш, на сьогоднішній день існує лише кілька ліцензованих пероральних вакцин проти кишкових інфекцій, характерними прикладами яких є вакцини проти холери та ротавірусу [58-60]. Проте в даний час нам не

вистачає хорошого розуміння, чому ці пероральні вакцини працюють, в той час коли інші цього не роблять. Це показує, що не можливо імітувати успішність вакцини, просто за допомогою використання схожих протоколів та реагентів [2].

Пероральні вакцини представляють найбільший виклик при розробці вакцин для слизових оболонок. Пояснюється це не тільки через суворі умови шлунково-кишкового тракту, які деградують більшість антигенних епітопів, що доставляються в розчинній формі, а й у зв'язку з анатомічними та фізіологічними особливостями слизових кишечника, які захищають від небажаних імунних реакцій до перетравлюваних антигенів. Безліч досліджень демонстрували успішні результати у експериментальних тварин з пероральною доставкою вакцин, хоча результати при наступних клінічних випробуваннях в основному були невтішними [52, 61].

Обмежена доступність вакцин, націлених на слизові оболонки, може бути тісно пов'язана з поганим розумінням імунної системи слизових та відсутністю ефективних і клінічно прийнятних допоміжних речовин для пероральної вакцинації. Однак, нещодавні прогреси дослідження імунної системи у слизових та розробка ад'ювантів дозволяє нам розглядати пероральну вакцинацію, як цілком імовірну альтернативу парентеральній вакцинації [62].

1.3 Ад'ювантні сполуки та їхнє використання

Спектр сполук, що використовуються в якості ад'ювантів, в даний час досить різноманітний, також як і механізми їхньої дії [63-65]. Вони мають широке застосування, а саме:

(i) забезпечують підсилення імунної відповіді шляхом доставки антигену в нативній формі;

(ii) зменшують кількість імунізацій, що дозволяє значно зменшити витрати;

(iii) посилюють імунну відповідь у дітей, людей з ослабленим імунітетом, а також людей літнього віку [64].

1.3.1 Ад'ювант і система доставки, як засіб індукції імунітету слизових оболонок

З метою підвищення ефективності вакцинації через слизові оболонки, можуть бути використані системи доставки з використанням частинок. Ідеальна система доставки з використанням часток для вакцинації через слизові поверхні повинна потрапляти у необхідні області слизової оболонки, дозволяти взаємодіяти антигену з клітинами що здійснюють захоплення і забезпечити захист вакцинного антигену під час доставки [66].

Направлення вакцин на слизові поверхні може бути досягнуто за допомогою відповідних способів введення або включення компонентів орієнтованих на слизові або М-клітини [67-69]. Крім того, форма і розмір частинок можуть впливати на взаємодії на клітинному рівні. Фагоцитуючі клітини, такі як макрофаги, здатні поглинати часточки мікронного розміру діаметром від 1 до 5 мкм, і тому таргетинг цих клітин дозволяє використовувати більші часточки [70]. На противагу цьому, клітини епітелію здійснюють ендоцитоз тільки тих частинок, які знаходяться в нанорозмірному діапазоні [71].

Досягнення нанотехнології можна використовувати для розробки вакцин направлених на слизові оболонки, при цьому здійснюючи індукцію бажаної імунної відповіді та захищаючи протеїновий компонент вакцини.

Серед різних варіантів пероральних вакцин, використання наночасток, як ад'ювантів для доставки протеїнових препаратів *per os*, є досить перспективним підходом [16]. Завдяки своїм унікальним властивостям наночастки можуть проникати через бар'єр слизових оболонок і переносити іммобілізований на них антиген всередину MALT, захищати протеїн від дії пошкоджуючих факторів ШКТ, та, відповідно, підсилувати імуногенність

антигену [72]. В якості носіїв для антигену використовують різноманітні наночастки створені на основі органічних полімерів, металів, ліпідів, ліпополісахаридів та ін. [66, 73-74]. Проте, фізико-хімічні властивості усіх цих носіїв досить різні, що може впливати на ад'ювантність таких наночасток, а також на взаємодію з антигеном та MALT.

Питання про ефективність ад'ювантних властивостей наночастинок різної природи, механізми їхнього розпізнавання імунною системою та їхній подальший трафік в організмі зараз активно досліджуються. Скажімо, подібні механізми було досліджено для PLA-наночастинок (на основі полілактату), що мають потенціал, як носії при пероральній вакцинації [75], наночастинок на основі хітозану, що пропонується використовувати для транспорту ДНК через слизові [76], тетрагалол- D -лізин дендримерних наночастинок (TGDK) [77] тощо.

1.3.2 Ад'юванти на основі золота

Багато неорганічних наночастинок вивчено для їхнього використання в якості ад'юванту при вакцинаціях [78]. Хоча ці наночастинки в основному небіодеградабельні, перевага їх полягає в жорсткій структурі і керованому синтезі [79]. Золоті наночастинки (Gold) використовуються для доставки вакцин [80], оскільки можна легко модифікувати їхню поверхню (сферичні, стрижні, кубічні і т. д.) [81], а також синтезувати в широкому розмірному діапазоні 2-150 нм [82,83]. Перевагою таких матеріалів є і їхні біоінертні властивості, що запобігають продукції специфічних анти- Gold антитіл та виникненню побічних ефектів. В той самий час Gold наночастки у комплексі з антигеном здатні посилювати антиген-специфічну продукцію антитіл, сприяють дозріванню ДК для обробки та презентації антигенів та сприяють утворенню антиген-специфічного Т-клітинного імунітету [84].

Було показано, що рівень експресії цитокінів макрофагами після інкубації з наночастками золота та срібла залежав від діаметру наночасток

[85]. Ці дані дозволяють припустити, що наночастки золота відповідного розміру можуть забезпечувати ефективну доставку та ад'ювантний ефект за їх використання в якості носіїв антигену.

В той самий час низкою дослідницьких груп продемонстровані суперечливі результати щодо залежності розміру часток золота та їхньої токсичності по відношенню до клітин. Одні дослідники повідомляли, що Gold наночастки діаметром 18 нм з різними варіантами модифікації поверхні поглинаються клітинами без цитотоксичного впливу [86]. Інші ж, навпаки, демонструють індукцію серйозних побічних ефектів на життєздатність клітин при впливі наночасток розміром 13 нм [87,88]. Цитотоксичність Gold наночасток по-різному описана, як нетоксична або токсична, залежно від розміру, концентрації, модифікації поверхні або поверхневого заряду.

1.3.3 Ад'юванти на основі фосфату кальцію

У Європі нанорозмірні композити на основі фосфату кальцію (CaP) використовувались, як ад'юванти для індукції імунітету проти антигенів дифтерії та правця, а також для десенсибілізації до алергенів [89]. Маючи подібні властивості до солей алюмінію, солі кальцію є природними сполуками організму людини, завдяки чому вони не мають токсичної дії і демонструють відмінну біосумісність. [90]. Ці сполуки здатні адсорбувати АГ, індукувати високий рівень продукції IgG, тим самим не викликаючи збільшення продукції IgE [91]. Вони нетоксичні і можуть бути сформовані у розмірі 50-100 нм [92]. До того ж використання солей кальцію є досить економічно ефективною системою в порівнянні з будь-якою іншою новою системою доставки лікарських засобів.

Розроблено широкий спектр схем синтезу CaP, починаючи від мікроемульсійних технологій до застосування цитрату, поверхнево-активних речовин, порфірину та олігонуклеотидів. Наночастинки фосфату кальцію можуть бути створені шляхом змішування хлориду кальцію, двоосновного

фосфату натрію та цитрату натрію в певних умовах [89,92]. Відзначено, що методики та умови синтезу композитів впливають на їхні фізичні, хімічні та ад'ювантні характеристики. Ці наночастки є корисними допоміжними речовинами для створення ДНК вакцин та імунізації слизових оболонок [92-93].

1.3.4 Ад'юванти на основі полімерних сполук

Ад'ювантні полімерні мікро-, наночастки на сьогоднішній день є найбільш поширеними сполуками у процесі створення вакцин. Ці біосумісні та біодеградабельні частки здатні включати в себе різні антигени. Однією з переваг часток на основі полімеру є здатність змінювати кінетику деградації часток, шляхом зміни відносної концентрації їхніх компонентів, а також контролювати час вивільнення АГ. Існують ад'юванти на основі полімерних сполук що деградують і не деградують в організмі [94, 95].

(і) Біодеградабельні полімерні сполуки. біодеградабельні полімерні нано-, мікрочастки привертають все більше уваги з точки зору їхнього біомедичного використання: для направленої доставки лікарських засобів, вакцин, генів. Вони мають субклітинний розмір (10-1000) нм, біологічно сумісні з тканинами та клітинами живих організмів, здатні контролювано та тривало (до кількох тижнів) вивільняти біологічні молекули, які в них містяться.

Полімерні частки здатні до захисту інкапсульованих в них сполук від екстремальних значень рН середовища, дії панкреатичного соку чи жовчі. Також вони збільшують імуностимулюючі властивості вакцинних АГ, тобто виконують функцію ад'ювантів. Ці частки поєднують в собі функції доставки, забезпечуючи захоплення АГ певними клітинами та стимуляцію активації АПК. АГ, як правило, знаходиться всередині часток [95, 96].

Полімерні частки створюють з різних природних та синтетичних полімерів. Найчастіше використовуються біодеградабельні полімери, які

представляють собою алифатичні складні полієфіри, такі як полімолочна кислота (PLA), полігліколева кислота (PGA), полікапролактон (PCL), полігидроксибутират (PHB) та їхні сополімери. Зокрема, PLGA на даний час найбільш вивчений для створення біомедичних виробів. Сополімер може підтримувати вивільнення інкапсульованого агенту протягом періоду від кількох днів до кількох тижнів. В даних препаратах АГ може бути інкапсульований у частку або адсорбований на поверхні часток. Вони виявляють депонуючий ефект по відношенню до антигену, із яких він поступово вивільняється. Більш того, полімерні частки можуть забезпечувати додатковий захист АГ, доставку та полегшення поглинання М-клітинами в слизовій оболонці цих сполук [97].

Полімерні частки здатні стимулювати, як гуморальну, так і клітинну імунну відповідь за рахунок наступних основних механізмів [96]:

1. Корпускулярна природа комплексів антиген-частка сприяє їхньому захопленню АПК та наступною доставкою АГ в лімфоїдні органи.
2. Захоплені АПК частки можуть виходити із ендосом в цитоплазму та стимулювати CD8⁺ Т-клітинну відповідь (перехресна презентація).
3. Полімерні частки можуть виконувати роль депо АГ, вивільняючи його протягом тривалого часу для презентації АПК. Ефективність цієї функції залежить від хімічного складу часток, поверхневих властивостей, біологічної сумісності (сприяє взаємодії з АПК), розміру (у відношенні з розміром АПК), стабільності АГ, особливостей кінетики його вивільнення. Процес виходу АГ із депо можна штучно контролювати зміною рН, температури, іонної сили та за допомогою електричних і магнітних полів.

Доклінічні дослідження показали, що мікро-, наночастки, основані на полімерних сполуках, можуть індукувати більшу продукцію АТ, ніж алюмінієві солі. Крім того, дослідження з використанням правцевого токсину показали синергічну імунну відповідь (тобто в чотири рази більш високу продукцію IgG). Це може бути досягнуто шляхом введення правцевого токсину, кон'югованим з алюмінієвими солями, навантаженим у наночастки

[97-99].

1.3.5 Ад'юванти на основі хітозану

Оскільки для розвитку імунної відповіді на антиген, що потрапив до слизових, критичним фактором є його взаємодія із М-клітинами, то підвищення імовірності контакту між антигеном та М-клітиною є ефективним методом покращення антигенного поглинання. Досягти цієї мети можна завдяки використанню компонентів які мають мукоадгезивні властивості, наприклад хітозан [100].

Хітозан, також відомий як 2-аміно-2-дезоксид-β-D-глюкан (N-ацетилглюкозамін), є катіонним полісахаридом, охарактеризований як потенційний ад'ювант для виготовлення вакцинних препаратів для людини через такі його властивості, як біосумісність та біодеградабельність [101]. Його отримують шляхом хімічного дезацитування хітину, одного з найбільш поширених полімерів у природі, який природно зустрічається в екзоскелеті ракоподібних, комах та деяких грибів [102, 103].

Важливим є і той факт, що покриваючи антиген хітозаном можна досягти не лише підвищення адгезивних властивостей, а і захистити його від протеолітичної дії ензимів та руйнування соляною кислотою завдяки стійкості хітозану до цих речовин. Також хітозан володіє ад'ювантними властивостями, що може додатково підвищувати імунну відповідь слизових на антиген [104, 105]. Схожу захисну та імуногенну дію при кон'югації з антигеном чинить і целобіоза.

1.4 Дифтерійний токсин як цільовий антиген

Дифтерійний токсин – це одноланцюговий поліпептид, який продукують бактерії виду *Corynebacterium diphtheriae* і є головним фактором патогенності збудника дифтерії. Сполука належить до токсинів типу АВ,

тобто складається з двох субодиниць, поєднаних дисульфідним зв'язком: А (active) – відповідає за модифікацію внутрішньоклітинного субстрату та порушення функціонування клітини, та В (binding) – яка відповідає за зв'язуванням з рецептором на поверхні клітини [106]. В свою чергу молекула токсину складається з трьох структурних доменів еквівалентних розмірів: каталітичний домен (С), домен транслокації або трансмембранний (Т), а також рецептор-зв'язуючий домен (R) (рис 1.1, А-Б). N-кінцевий С-домен (утворений амінокислотними залишками 1-193) відповідає субодиниці А, яка володіє нуклеазною та АДФ-рибозилтрансферазною каталітичною активністю. Дія субодиниці А заключається в блокуванні протеїнсинтезуючої системи клітини, що викликає її апоптоз. Субодиниця В складається із рецепторного R-домену (амінокислотні залишки 386-535) та трансмембранного Т-домену (залишки 205-378) (рис. 1.2). Т-домен відповідає за взаємодію молекули токсину з мембраною ендосом та транслокацію субодиниці А до цитозолу клітини [106].

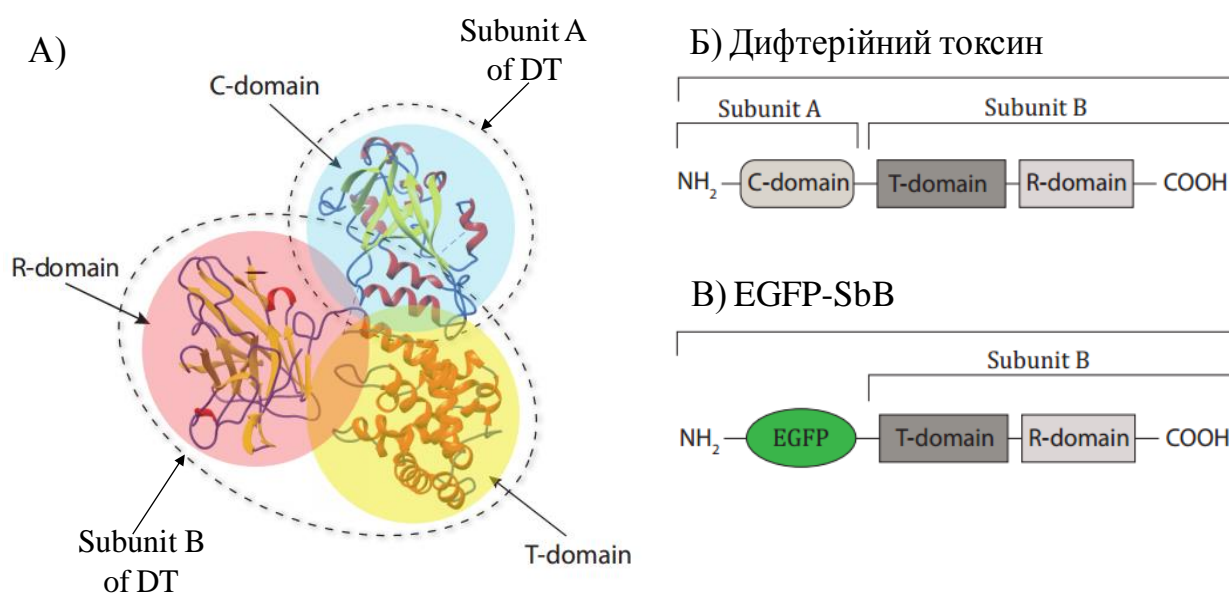


Рисунок 1.1. Будова дифтерійного токсину та його рекомбінантного похідного: А) будова нативного дифтерійного токсину за рентгено-структурним аналізом, Б) схематична будова нативного дифтерійного токсину, В) схематична будова рекомбінантного похідного дифтерійного

токсину – субодиниці В міченої флуоресцентним протеїном EGFP (EGFP-SubB).

ДТ продукується бактерією в місцях колонізації на слизових оболонках, а отже індукція потужного антитоксичного імунітету в слизових потенційно здатна захистити організм від інфекції. Саме тому вибір рекомбінантного фрагменту ДТ, як антигену для дослідження вакцинації через слизові оболонки є перспективним та практичним підходом. Очікується, що розробка нових підходів до пероральної вакцинації дозволить створити засоби підсилення імунітету слизових за рахунок індукції захисних антитіл класу А, що для ряду захворювань, зокрема, для дифтерії, є вирішальним для захисту від інфекції та токсичного ураження.

Як цільовий антиген для проведення імунізації було вибрано рекомбінантне похідне дифтерійного токсиду – субодиниця В, мічена флуоресцентним протеїном EGFP (EGFP-SubB) (рис. 1.1, В). Наявність флуоресцентного протеїна EGFP у конструкції рекомбінантного похідного субодиниці В суттєво стабілізує протеїн, а тому покращує його сорбційні властивості. До того ж флуоресцентна мітка у складі конструкції дає можливість візуалізувати процеси зв'язування протеїну, що можна використати у таких методиках, як протокова цитофлуориметрія, конфокальна мікроскопія та інші.

Обраний нами як цільовий антиген – рекомбінантний протеїн EGFP-SubB, є досить перспективним для формування протективного протидифтерійного імунітету. Адже основні ушкодження та летальність при дифтерії обумовлюються дією дифтерійного токсину, тому імунітет до дифтерії залежить від наявності антитіл проти токсину. Нейтралізуюча активність антитіл може бути пов'язана із їхньою здатністю блокувати зв'язування В фрагменту дифтерійного токсину із рецептором, здатністю порушувати роботу транспортного Т-домену (цей домен знаходиться в складі В субодиниці і відповідає за транслокацію каталітичного фрагменту до

цитозолу клітин-мішеней) або інгібувати каталітичну активність А фрагменту, що опосередковує блокаду синтезу протеїна та подальшу загибель клітин. Антитіла, які перешкоджають зв'язуванню токсину із клітинами-мішенями діють ще до потрапляння токсину у клітини, а тому їх можна вважати найбільш «надійним» захистом.

Де висновок по оглядовій частині та перехід до експериментальної частини?

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1 Матеріали та обладнання

2.1.1 Матеріали та реактиви

У роботі були використані: PLGA (полі(D,L-лакдид-ко-гліколева)кислота), полівініловий спирт (PVA), дихлорометан (ДХМ), діоктилсульфосукцинат натрія, целобіоза, хітозан (CS) («Sigma», США), танінова кислота, цитрат натрію, HAuCl_4 , K_2CO_3 , CaCl_2 , Na_2HPO_4 , HCl , H_2SO_4 , NaOH , KCl , NaCl , KH_2PO_4 , Na_2CO_3 , NaHCO_3 , NaN_3 (Міранда-С, Україна), середовища для бактерій LB (Helicon, Росія), бактеріологічні петлі, чашки Петрі, агар (Helicon, Росія), агароза («Sigma», США), IPTG (isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside) (Thermo Scientific), Ni^{2+} -NTA агароза (Qiagen, Німеччина), персульфат амонію, тетраметилетилендіамін (ТЕМЕД), акриламід, N, N' – метилен-біс-акриламід, β -меркаптоетанол, трицин («Sigma-Aldrich», США), додецилсульфат натрію (ДСН) («Sigma-Aldrich», США), БСА, сечовина, бром феноловий синій, кумасі блакитний G-250, імідазол, трис(гідроксиметил)амінометан (Tris) («Sigma-Aldrich», США), люмінол, нітроцелюлоза («Amersham Biosciences», США), 3,3' – діамінобензидин тертрагідрохлорид (DAB), 3,3',5,5'- тетраметилбензидин (ТМБ), гліцерин, етиловий спирт, метиловий спирт, оцтова кислота, диметилсульфоксид (ДМСО), етилендіамінтетраоцтова кислота (ЕДТА), хлорамфенікол, ампіцилін, канаміцин, глюкоза (Київмедпрепарат, Україна), параформальдегід, Mowiol-DABCO (1,4-дізабіцикло[2, 2, 2]октан), флуоресцеїн ізотіоціанат (FITC), Triton X-100 («Sigma-Aldrich», США), Tween 20 (Helicon, Росія), трипановий синій, барвник для контрастування ядер Hoechst 33342, пропідій йодид, маркери для електрофорезу протеїнів, коктейль інгібіторів протеїназ (prod #1861279, Thermo Scientific),

моноклональні антитіла (Beckman Coulter, США), культуральні флакони та чашки для культури тканин (Greiner Bio One, Німеччина), середовище RPMI-1640 з L-глутаміном та індикатором, фетальна сироватка телят (FBS), пеніцилін, стрептоміцин, амфотеріцин, МТТ (3-(4,5-діметилтіазоліл-2)-2,5-діфенілтетразоліум бромід), одноразовий лабораторний посуд (Delta Lab, Іспанія) та інші реактиви кваліфікації х.ч. або ч.д.а. Ультра чиста вода була отримана з використанням системи очищення води Adrona.

2.1.2 Обладнання

Камера для вертикального електрофорезу (Bio-Rad, США), орбітальний шейкер-термостат ES-20, CO₂-інкубатор, ультразвуковий дезінтегратор Labsonic M (Sartorius, Німеччина), прилад для електропорації Electroporator 2510 (Eppendorf, Німеччина), спектрофотометр GeneQuantoPro (Amersham Biosciences, США), шафа-ламінар (Holten, Франція), мультилункові рідери μQuant ELx800 (BioTek, США), рН-метр CyberScan 510 (Eutech Instruments, Сінгапур), мікроцентрифуга А-14 (Joan, Франція), охолоджувач SC-2М та нагрівач зразків TDD-120 (Biosan, Латвія), холодильно-опалювальна установка (рефрижератор) (Joan, Франція), аналітичні ваги WAA 210/C/1 (Salex, Данія), конфокальний мікроскоп Carl Zeiss LSM 510 Meta (Carl Zeiss, Німеччина), протоковий цитофлуориметр Coulter Epics XL (Beckman Coulter, США).

2.1.3 Лабораторні тварини, культури клітин евкаріот, експресійні штами бактерій та вектори, що були використані у дослідженні

В експериментах було використано наступні клітинні лінії евкаріот: клітинна лінія U937 – моноцитарні клітини лімфоми людини, які були ізольовані з гістоцитарної лімфоми і використовуються для вивчення диференціації моноцитів; клітинна лінія L929 представляє собою клітини

фібросаркоми миші; клітинна лінія J774 – макрофагоподібні клітини, що походить з ретикулоклітинної саркоми миші; клітинна лінія Raji - В-клітини людини, одержані з клітин лімфоми Беркита 11-річного хлопчика; клітинна лінія KG-1 - макрофагоподібні клітини людини, одержані з клітин кісткового мозку 59-річного пацієнта, хворого на гостру мієлогенну лейкемію. Більшість модельних клітин були отримані з банку клітинних ліній Інституту експериментальної патології, онкології та радіобіології імені Р.Є. Кавецького НАН України.

Бактеріальні клітини *Escherichia coli* штамів BL21 (DE3) Rosetta та DH10B (Novagen, США).

Плазмідні вектори для експресії протеїнів в прокариотичній системі експресії pET-24a(+) та pET-28a(+).

Всього в експериментальних дослідженнях було використано мишей *Mus musculus* лінії BALB/c розведення віварію Інституту фармакології та токсикології НАМН України, самиці віком 6-8 тижнів та вагою 18-23 г. Тварини утримувались за стандартних умов щодо освітлення (12/12), температури (20-23° C) та вологості (30-35%) у віварії Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України відповідно до «Стандартних правил по упорядкуванню, устаткуванню та утриманню експериментальних біологічних клінік (віваріїв)». Всі маніпуляції з тваринами проводили у відповідності до вимог регіонального Комітету з етики роботи з піддослідними тваринами та з дотриманням правил роботи з лабораторними тваринами відповідно до «Загальних принципів експериментів на тваринах», схвалених I–III Національними конгресами з біоетики (Київ, 2001–2007 рр.) і узгоджених з положеннями директиви Ради Європейського Союзу 86/609/ЕС «Про зближення законів, постанов та адміністративних положень держав ЄС з питань захисту тварин, що використовуються для експериментів та інших наукових цілей» від 24 листопада 1986 р.

2.1.4 Програмне забезпечення

Аналіз електрофореграм – TotalLab Quant, зображень з конфокального мікроскопу – FIIJ, обробка даних з протокового цитофлуориметра – FCS Express v3.0 та Flowing Software 2.5.1. Побудова графіків і діаграм – Origin 8.0 та Microsoft Excel (Microsoft corporation, США). Створення і упорядкування рисунків – Adobe Photoshop CS5 2014 та CorelDraw 2018. Оформлення дисертаційної роботи – Microsoft Word згідно правил та рекомендацій наказу №40 від 12.01.2017 «Про затвердження Вимог до оформлення дисертацій».

2.2 Методи

2.2.1. Експресія рекомбінантних антигенів в прокаріотичній системі експресії *E.coli*

Генетичні конструкції, що кодують рекомбінантні протеїни, які використовуються в дисертаційній роботі були створені в лабораторії імунобіології відділу молекулярної імунології Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України та описані у попередніх роботах, а саме: рекомбінантна субодиниця В дифтерійного токсоду (SubB) злита з флуоресцентними протеїнами EGFP (EGFP-SubB) та mCherry (mCh-SubB) [6, 7]; рекомбінантна SubB зшита з альтернативним тагом GST та не містить флуоресцентної мітки EGFP (GST-SubB); рекомбінантний фрагмент протеїну А *Staphylococcus aureus* з унікальною послідовністю, який складається з чотирьох доменів: D–E–A–A (SpA) [107]; рекомбінантний внутрішньоклітинний еукаріотичний протеїн убіквітин (Ubq).

Експресію у всіх випадках проводили в клітинах *E. coli* штаму BL21 Rosetta (DE3) шляхом індукції 1 mM IPTG [108, 109]. Клітини продуцентів вирощували на середовищі LB Broth (Lennox) (10 г/л бакто-триптон, 5 г/л

дріжджового екстракту, 5 г/л NaCl) ("Fluka", Швейцарія), що містило 50 мкг/мл канаміцину, до густини, що відповідає $A_{600}=0,3-0,5$. Після цього додавали індуктор експресії IPTG до кінцевої концентрації 1 мМ, і залишали на 3-4 год за 30° С при активній аерації. Після цього клітини осаджували центрифугуванням, видаляли надосадову рідину, а клітинний осад використовували для виділення цільового протеїна.

2.2.2. Виділення та очищення рекомбінантних протеїнів методом метал-афінної хроматографії

Досліджувані рекомбінантні протеїни продукуються злитими з полігістидиновим тагом (маркерна послідовність, яка кодується плазмідною ДНК *pET28a*), що дозволяє виділяти його методом метал-афінної хроматографії на сорбенті Ni-NTA агароза.

Всі маніпуляції, пов'язані з отриманням протеїнів із бактерій та їхньою очисткою, проводили у нативному буфері для Ni-NTA агарози: 100 мМ Na_2HPO_4 , 10 мМ Tris·Cl, 500 мМ NaCl, pH 8,0. Клітинний осад розчиняли у буфері для відмивання, що містив 8 М сечовину, обробляли ультразвуковим дезінтегратором Labsonic ("Sartorius", ФРН) та осаджували клітинний дебрис шляхом центрифугування за 12 000 g протягом 20 хв. Надосадову рідину наносили на колонку, врівноважену буфером для відмивання з 8 М сечовиною. Колонку промивали 15-ма об'ємами буфера для відмивання, що містив 8 М сечовину. Після цього колонку послідовно промивали 4-ма об'ємами буфера з 6 М сечовиною, 4 М сечовиною, 2 М сечовиною і врешті 10-ма об'ємами буфера для відмивання без сечовини. Також, щоб позбутися протеїнів, які не мають таг, але містять чисельні гістидинові амінокислотні залишки, колонку промивали буфером для відмивання з імідазолом з фінальною концентрацією 10 мМ. Цільовий протеїн елюювали буфером для відмивання, що містив імідазол до кінцевої концентрації 410 мМ після чого

діалізували проти ФБР (0,8% NaCl, 0,02% KCl, 0,144% Na₂HPO₄, 0,024% KH₂PO₄, pH 7,4).

Чистоту та концентрацію цільових рекомбінантних протеїнів в отриманих пробах оцінювали за допомогою методу ДСН-ПААГ-електрофорезу за [110].

2.2.3. Методи отримання часток різного розміру та хімічної природи.

(1) Для синтезу часток золота використовували натрій-цитратний метод, заснований на відновленні цитратом натрію золотохлористоводневої кислоти [111]. Для отримання частинок бажаного розміру та їхньої кон'югації із протеїном-антигеном брали за основу модифікації розроблені нами раніше [112]. Склад реакційних сумішей для різних варіантів синтезу часток наведено у табл.2.1.

Таблиця 2.1

Склад реакційних сумішей для синтезу часток золота різного розміру

Реагент № проби	1% водний розчин HAuCl ₄ , мкл	1% водний розчин Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇ мкл	1% водний розчин K ₂ CO ₃ , мкл	0,03% C ₇₆ H ₅₂ O ₄₆ (танінова кислота), мкл	H ₂ O, мкл
Gold 1	50	200	5	75	670
Gold 2	50	200	50	7,5	700

У різних пробірках попередньо нагрівали до 60⁰C суміші (HAuCl₄+ H₂O) та (Na₃C₆H₅O₇+ K₂CO₃+ C₇₆H₅₂O₄₆), змішували та інкубували за 60⁰C.

Інкубацію проводили протягом 20 хв. Після цього пробірки переносили на 0°C та повністю охолоджували.

Для кон'югації до синтезованих розчинів золота додавали рекомбінантну субодиницю В ДТ у 0,2% Na-цитратному буфері. Додавали з розрахунку 340 мкг субодиниці В на 1 мг колоїдного золота та інкубували протягом 40 хв за 0°C. Щоб позбавитись від незв'язаного протеїна частинки золота осаджували центрифугуванням протягом 15 хв за 12 000 g. З метою підвищення стабільності кон'югату осад, після осадження, розчиняли в 1 мл 129 мМ целобіози з 0,2% натрій цитратом, ресуспендували і інкубували 24 год при 4°C. Надалі частинки золота осаджували центрифугуванням протягом 15 хв за 12000 g, ресуспендували осад у 1 мл 0,2% цитрату натрію.

(2) Метод синтезу часток фосфату кальцію базується на принципі утворення нерозчинних часток фосфату кальцію при змішуванні розчину солей кальцію та фосфату у присутності цитрату натрію, схема синтезу вказана нижче є модифікацією раніше описаного методу [93, 113]. Для синтезу наночасток на основі фосфату кальцію змішували розчини 12,5 мМ CaCl₂, 12,5 мМ Na₂HPO₄ та 15,6 мМ цитрату Na у співвідношеннях 7,5:7,5:1,5. На 8,25 мл такої суміші додавали 1 мл розчину протеїна EGFP-SubB (800 мкг). Причому всі вище згадані розчини для синтезу часток додавали по чергово у розчин протеїна, такий підхід дозволяв сополімеризувати протеїн з частками. Отримані суміші перемішували на магнітній мішалці протягом 48 год при 4°C. Частинки стабілізували целобіозою, яка додавалася у концентрації 129 мМ в ФБР. Утворені частинки осаджували за 12 000 g 3 хв та ресуспендували у 2 мл розчину целобіози, інкубували протягом 24 год при 4°C. Далі розчин осаджували центрифугуванням за 12 000 g протягом 3 хв та розчиняли в 1 мл буферного розчину ФБР.

(3) Методика 1 отримання часток PLGA (PLGA 1) більш спрощена порівняно з методикою 2, оскільки заснована на методі заміщення розчинника. Частки формуються при перемішуванні на магнітній мішалці водної фази, в яку поступово додається розчин сополімеру лактиду та гліколіду в ацетоні (органічна фаза). Надалі органічний розчинник випаровується, а частинки PLGA 1 залишаються в розчині [114].

Описана методика синтезу PLGA 1 наночасток була адаптована з описаного раніше методу [115]. Для синтезу PLGA 1 наночасток 15 мг сополімеру лактиду та гліколіду розчиняли в 3 мл ацетону. Отриманий розчин (органічна фаза) додавали краплинами до водної фази об'ємом 30 мл, одночасно з перемішуванням на магнітній мішалці за кімнатної температури. Надалі випаровували органічну фазу протягом ночі (~12 год) за кімнатної температури, після чого розчин наночасток профільтрували через фільтр 1 мкм. Приготований водний розчин PLGA 1 частинок можливо було використовувати для сорбції антигену.

Отримані PLGA 1 частинки попередньо осаджували центрифугуванням за 12 000 g протягом 3 хв, та розводили осад частинок у 1 мл буферного розчину ФБР з протеїном EGFP-SubB (0,12 мг/мл). Сорбцію антигену проводили протягом ночі (~12 год) при інтенсивному перемішуванні на магнітній мішалці за 4°C. Після чого, для видалення незв'язаного антигену, частинки осаджували центрифугуванням за 12 000 g протягом 3 хв, осад розчиняли у 1 мл буферного розчину ФБР.

(4) Методика 2 синтезу часток PLGA (PLGA 2) заснована на принципі подвійної емульсифікації з використанням методу випаровування розчинника. Сополімер лактиду та гліколіду розчиняється в органічній фазі метилен хлориду шляхом інтенсивної гомогенізації, що призводить до формування органічної емульсії (т.зв. water-in-oil emulsion). Далі така емульсія змішується з водною фазою та добре розмішується шляхом гомогенізації - утворюється водна емульсія (т.зв. water-in-oil-in-water

emulsion). Після цього органічний розчинник випаровується, як результат - утворюється водний розчин частинок PLGA 2 [116].

Схема синтезу PLGA 2 частинок базувалася на описаному раніше методі [115] з певними модифікаціями і полягала в наступному: 0,3 г полі(D,L-лактид-ко-гліколіду) розчиняли в 5 мл метилен хлориду, додавали 1 мл ФБР та гомогенізували за 14 000 об/хв 3 хв гомогенізатором *MPW-309* (Universal Laboratory Aid, Польща). 6 мл отриманої емульсії змішували з 30 мл 0,5% (від маси доданого полі(D,L-лактид-ко-гліколіду) водного розчину діоктилсульфосукцинату. Отриману суміш гомогенізували на льодяній ванні 10 хв за 7 500 об/хв гомогенізатором *MPW-309*. Після цього суспензію перемішували на магнітній мішалці протягом ночі (~12 год) за кімнатної температури для випаровування органічного розчинника. Отримані PLGA 2 частки осаджували центрифугуванням за 12 000 g протягом 3 хв, та розводили осад часток у 1 мл буферного розчину ФБР з протеїном EGFP-SubB (0,12 мг/мл). Сорбцію антигену проводили протягом ночі (~12 год) при інтенсивному перемішуванні на магнітній мішалці за 4°C. Після чого, для видалення незв'язаного антигену, частинки осаджували шляхом центрифугування за 12 000 g протягом 3 хв, осад розчиняли у 1 мл буферного розчину ФБР.

(5) Методика синтезу PLGA 2* частинок також заснована на принципі подвійної емульсифікації розчинів PLGA з використанням методу випаровування розчинника з тою відмінністю, що антиген додавався на етапі синтезу часток, за рахунок чого ми отримували частки з інкапсульованим антигеном всередині часток. Схема синтезу PLGA 2* базувалася на описаному раніше методі [117] з певними модифікаціями і полягала в наступному: 10 мг полі(D,L-лактид-ко-гліколіду) розчиняли в 2 мл метилен хлориду; розчин антигену змішували з розчином полівінілового спирту (PVA) до фінальної концентрації протеїну 1 мг/мл та 0,5% PVA. Розчин PLGA вносили по краплинам до розчину протеїна з одночасною дією

ультразвуковим дезінтегратором (амплітуда 90%, цикл 0,9) протягом 1 хв. Сформовану емульсію вносили по краплинам до 8мл водної фази 1% розчину PVA, знову ж таки, за дії ультразвуку протягом 10 хв. Всі дії проводили на льодяній бані. Утворену суміш залишали на магнітній мішалці за кімнатної температури протягом ночі (~12 год) для випаровування органічного розчинника. Після випаровування розчинника утворену суспензію осаджували центрифугування за 12 000 g протягом 3 хв, та розводили осад у 1 мл буферного розчину ФБР.

2.2.4. Покриття часток на основі полі(D,L лактид-ко-гліколіду) хітозаном

Для захисту часток від агресивних умов ШКТ та підсилення адювантних властивостей, синтезовані сполуки PLGA покривали хітозаном. Схема синтезу часток покритих хітозаном базувалася на описаному раніше методі [118] з певними модифікаціями. Отриману суспензію часток вносили по краплинам у водний розчин, що містить хітозан (CS) та PVA і обробляли ультразвуком протягом 7 хв на льодяній бані. Концентрація CS та PVA становила, відповідно, 0,75% та 0,5%. Утворений розчин залишали при кімнатній температурі за постійного помішування на 2 год, після чого утворені частки двічі відмивали буферним розчином ФБР шляхом центрифугування за 12 000 g протягом 3 хв, та розводили осад у 1 мл ФБР.

2.2.5. Оцінка ефективності навантаження антигеном

Електрофоретичне розділення отриманих часток проводили в поліакриламідному гелі з додецилсульфатом натрію за модифікованою методикою Schagger H. [110] з додаванням 0,1 М трицину до катодного буферного розчину. Протеїнові препарати в буфері для зразків (6 М сечовина, 4% ДСН, 5% β -меркаптоетанол, 20% гліцерин, бромфеноловий

синій) були прогріті до 85° С 5 хв перед нанесенням. Розділення протеїнів проводили в 10% ДСН-ПААГ електрофорезі. Як електродні буфери використовували анодний буфер (0,2 М Tris, рН 8,9) та катодний (0,1 М трицин, 0,1 М Tris, 0,1% ДСН). Для ідентифікації протеїнів гель забарвлювався у розчині кумасі блакитного G-250.

Ефективність іммобілізації антигену на частках визначали з електрофореграми денситометричним методом за допомогою програмного забезпечення TotalLab TL120, Fiji та OriginLab. Для цього проводили електрофорез вихідного розчину протеїна та розчину із протеїном, що не зв'язався після проходження реакції. На основі отриманих даних розраховано ефективність іммобілізації протеїну (EI):

$$EI (\%) = \frac{AI}{AA} \times 100, \text{ де}$$

AA - кількість протеїну до іммобілізації (мг); AI - кількість зв'язаного протеїну (мг)

Визначали також і навантаження часток. Розрахунки проводили за формулою, наведеною нижче:

$$НЧ (\%) = \frac{AI}{AM} \times 100, \text{ де}$$

AI - кількість зв'язаного протеїну (мг); AM – кількість синтезованих часток (мг).

2.2.6. Дослідження морфології отриманих часток

Морфологія і зовнішній вигляд частинок були досліджені за допомогою скануючої електронної мікроскопії (СЕМ). Дослідження проводили за допомогою електронного скануючого мікроскопу Tescan Mira 3 LMU з прискорюючою напругою 10кВ. Зразок наносився на рівну підкладку, для уникнення накопичення заряду зразок вкривався тонким шаром металлу (20 нм Au/Pd з використанням системи Gatan PECS). Для вимірювання

діаметру синтезованих частинок, згідно даних електронної мікроскопії, використовували програмне забезпечення ImageJ v1.43u (NIH, USA).

2.2.7. Дослідження розподілу отриманих часток за розміром методом лазерної кореляційної спектроскопії

Визначення розмірів часток проводили двома різними методами: ЛКС (Dynamic light scattering) - лазерна кореляційна спектроскопія та NTA (Nanoparticle Tracking Analysis) - аналіз траєкторії часток;

Для вивчення функції розподілу частинок за розміром використовуючи лазерний кореляційний спектрометр, аналізи були проведені на приладі ZetaSizer3 (Malvern Instrument, Великобританія). Розміри вимірювали в оптичній скляній кюветі діаметром 10 мм у термостатованій лунці лазерного кореляційного спектрометра. Розсіяне випромінювання від гелій неоновому лазера ЛГ111 потужністю 25 мВт та довжиною хвилі 633 нм вимірювали протягом 300–400 с та реєстрували на аналізаторі спектра multi computing correlator type 7032 ce. Отриману автокореляційну функцію обробляли за допомогою комп'ютерної програми PCSSize mode v1.52.

2.2.8. Дослідження розподілу отриманих часток за розміром методом аналізу траєкторії часток

Для NTA аналізу часток зразки були проаналізовані на Malvern NanoSight NS300 з останньою версією програмного забезпечення 3.2, оснащеного лазером 488 нм, шприцовим насосом та високочутливою CMOS-камерою. Для кожного аналізу було записано відеокліпи на 60 секунд

2.2.9. Визначення швидкості вивільнення протеїнів з часток

Синтезовані частки навантажені протеїном, було розведено в розчині ФБР та рознесено на каскад пробірок. Зразки витримувались в термостаті при стабільній температурі, близькій до фізіологічної температури людського тіла, 37°C протягом різного часу: 1 день, 3 дні, 6, 13, 17, 22, 28 та 34 днів. У відповідний день пробу часток центрифугували та відбирали надосадову рідину що містила вивільнений протеїн. Процес вивільнення протеїну, інкапсульованого в частках, визначали за допомогою електрофорезу за використання програм Fiji та OriginLab.

2.2.10. Культивування еукаріотичних клітин в умовах *in vitro*

Клітини J774, U937, L929 культивувались на поживному середовищі RPMI-1640 з L-глутаміном, що містила 10% фетальної сироватки великого рогатого скота, стрептоміцин (100 мг/л), пеніцилін (10 000 U) та амфотеріцин В (250 мкг/л) за 5% CO₂ в атмосфері. Культуру клітин культивували в культуральних флаконах Grenier ("Sartorius", ФРН), в 5% атмосфері CO₂ при 37 °C. За 12 год перед дослідженнями, клітини розсаджували на 2,5 см чашки по 0,5·10⁶ клітин/чашка та культивували за вищезгаданих умов.

2.2.11. Визначення життєздатності клітин з використанням МТТ тесту.

МТТ тест базується на визначенні дихальної активності клітин. МТТ (3-(4,5-діметилтіазоліл-2)-2,5-діфенілтетразоліум бромід) відновлюються метаболічно-активними клітинами до фіолетових кристалів формазану, вміст якого можливо вимірювати спектрофотометрично [119].

Для дослідження цитотоксичного впливу часток клітини ліній L929 та U937 висівали у 96-лункові планшети з розрахунку 50 000 клітин на лунку,

додавали до них контрольний протеїн або частки у концентраціях 0,1 мг/мл, 1 мг/мл, 10 мг/мл та 25 мг/мл та інкубували 12 год. Для розрахунку напівлетальних доз (IC_{50}) для часток з встановленим цитотоксичним впливом попередньо нарощені клітини ліній L929 та U937 інкубували в середовищі з концентраціями Gold 1 та Gold 2 від 0,1 мг/мл до 7 мг/мл, а також лінії U937 з концентраціями наночасток СаР від від 0,1 мг/мл до 27 мг/мл. Проби інкубували протягом 12 год, 37⁰С, 5% CO₂.

Життєздатність клітин визначали за допомогою МТТ-тесту, як описано у [120, 121] у власній модифікації. Для цього вміст середовища в лунках замінювали на новий з додаванням МТТ-реагенту (Sigma, США), згідно рекомендацій виробника та інкубували 4 год. Після цього розчин МТТ-реагенту замінювали на лізуючий: 10% SDS, 0,6% оцтової кислоти у диметилсульфоксиді (ДМСО) для розчинення фіолетових кристалів формазану та визначали його оптичне поглинання на мікропланшетному рідері Stat Fax 2100 (Awareness Technology, США) на 650 нм, проти 545 нм. Результати цього тесту отримані в трикратних повторах.

З метою визначення напівлетальних доз часток експериментальні дані було проаналізовано за допомогою програмного забезпечення для аналізу графічних даних SigmaPlot. За результатами ітеративного моделювання оптимальним рівнянням, яке описує експериментальні точки, було отримано трипараметричне рівняння сигмоїдальної дозозалежної кривої:

$$y = \min + \frac{\max - \min}{1 + 10^{(\log IC_{50} - x)}}$$

де x – концентрація агента (часток), який інгібує ріст клітин, y – кількість життєздатних клітин за x концентрації часток, \min – життєздатність клітин без впливу інгібітора росту, \max – життєздатність клітин за максимальної концентрації інгібітора росту, IC_{50} – напівлетальна доза.

2.2.12. Визначення шляху загибелі клітин з використанням Анексину V та етидію броміду.

Для визначення шляху загибелі клітин використовували рекомбінантний протеїн Анексину V мічений флуоресцентною міткою EGFP, що у Ca-залежний спосіб специфічно взаємодіє з фосфатидил серином [122] та етидій броміду (EtBr), що є флуоресцентним ДНК інтеркалятором з максимальною довжиною хвилі поглинання 520 нм та максимумом флуоресценції 600 нм, інтенсивність флуоресценції якого збільшується у 20 разів при взаємодії з ДНК.

За 12 год перед проведенням експерименту по визначенню шляху загибелі клітин клітини ліній L929 та U937 висівалися у 24-лункові планшети з розрахунку 500 000 клітин на лунку. Після попередньої інкубації клітин до них вносили відповідні дози часток або контрольного протеїну та інкубували ще 12 годин. Після чого клітини осаджувалися центрифугуванням за 300 g протягом 10 хв, та розводили у 500 мкл розчину 10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 1,8 mM CaCl₂ з додаванням 10 мкг рекомбінантного Annexin V-EGFP та 6 мкг EtBr. Клітини інкубували 15 хв за кімнатної температури, та надалі зберігали при 4°C. Аналіз зразків проводили на протоковому цитофлуорометрі Coulter Epics XL (Beckman Coulter) з аргонним лазером (фіксована збуджуюча довжина хвилі – 488 нм) використовуючи такі параметри: пряме (мале кутове) світлорозсіювання та бічне світлорозсіювання, а також інтенсивність флуоресценції за каналами FL1 (515-535 нм) та FL3 (610-630 нм).

2.2.13. Аналіз ефективності фагоцитозу отриманих часток методом протокової цитометрії

Перед фагоцитарним тестом, адгезовані на чашках клітини J774 промивали двічі по 1 мл БСА/ФБР (1% БСА, рН 7,2). Для аналізу

ефективності фагоцитування клітинами часток, додавали частинки в 1 мл БСА/ФБР з розрахунку по 3 мкг іммобілізованого протеїну на частинках на пробу. Інкубацію проводили протягом 5 хв, 30 хв, 60 хв та 120 хв при 37⁰С та підвищеній концентрації CO₂ у середовищі. Для видалення незв'язаних часток, клітини промивали двічі по 1 мл БСА/ФБР.

Для аналізу проб на протоковому цитофлуориметрі клітини, що фагоцитували частинки за описаною вище схемою, необхідно було зняти з чашки, тому змінювали середовище на розчин EDTA/ФБР (0,03 М EDTA, рН 7,2), інкубували 10 хв при 40С. Відмивали клітини та пропускали їх через тонку шприцеву голку з метою розбиття конгломератів клітин. Далі клітини осаджували центрифугуванням за 200-300 g протягом 10 хв, відбирали надосадову рідину, доводили загальний об'єм проби до 1 мл БСА/ФБР та переносили забарвлені клітини у пробірки для цитофлуориметра. Визначення інтенсивності флуоресценції клітин проводили за допомогою проточного цитофлуориметра Coulter Epics XL („Beckman Coulter”, США) (фіксована збуджуюча довжина хвилі – 488 нм) використовуючи такі параметри: пряме (мале кутове) світлорозсіювання та бічне світлорозсіювання, а також інтенсивність флуоресценції за каналом FL1 (515-535 нм).

2.2.14. Мічення часток флуоресцентною міткою FITC.

З метою посилення флуоресцентного сигналу часток, їх кон'югували з флуоресцентною міткою FITC за поданою нижче схемою. Попередньо 2,5 мг FITC розчиняли в 1 мл ДМСО. Далі всі частинки переводили в ФБР шляхом центрифугування при 12 000 g, 3 хв – для CaP та PLGA 2, 15 хв – для PLGA 1, Gold 1 та Gold 2, та подальшого розчинення осаду у цьому буферному розчині. Після цього додавали по 100 мкл розчину FITC на 10 мкг іммобілізованого на частинках протеїну та закривали розчин фольгою з метою зменшення процесу деградації FITC. Інкубували частинки з помішуванням протягом 2 год при кімнатній температурі. Після інкубації

частинки осаджували за вищевказаних умов, декілька разів промивали ФБР для відмивання незв'язаного FITC та переводили в ФБР для зберігання.

2.2.15. Аналіз ефективності фагоцитозу отриманих часток методом конфокальної мікроскопії.

Для аналізу проб на конфокальному мікроскопі клітини J774, вирощені на скельцях, промивали двічі по 1 мл БСА/ФБР (1% БСА, рН 7,2). Для аналізу ефективності фагоцитування клітинами часток, додавали частинки в 1 мл БСА/ФБР з розрахунку по 2,5 мкг іммобілізованого протеїну на частинках на пробу. В якості барвника ядер клітин використовували Hoechst 33342, який додавали одночасно з частками до концентрації 10 мкМ у середовищі. Інкубацію проводили протягом 60 хв при 37⁰С та підвищеній концентрації CO₂ у середовищі. Після чого промивали клітини двічі по 1 мл БСА/ФБР та додавали розчин 4% параформальдегіду у 0,1 М Na-фосфатному буферному розчині з метою фіксації клітин, інкубували 40 хв при 4⁰С. Далі двічі відмивали незв'язаний параформальдегід розчином ФБР та останній раз дистильованою водою. На скельця наносили по 25 мкл розчину MOVIOL/Dabco, що сповільнював вигорання флуорофора та стабілізував клітини, та фіксували покривельне скло з клітинами на предметному склі. Препарати аналізували за допомогою конфокального мікроскопу Carl Zeiss LSM 510 Meta окремо за трьома каналами: збудження – 405 нм, детекція – 420-480 нм – флуоресценція Hoechst 33342; збудження – 488 нм, детекція – 505-570 нм – флуоресценція EGFP або FITC; збудження – 543 нм, детекція – від 560 нм – автофлуоресценція клітин.

2.2.16. Імунізація мишей отриманими кон'югатами часток з антигеном та забір проб крові

Отриманими кон'югатами часток з антигеном імунізували самиць мишей *Mus musculus* BALB/c однакового віку та маси. Безпосередньо за 24 год перед імунізацією мишей позбавляли води. Надалі мишей імунізували *per os* по 25 мкл суспензії часток або протеїнів в ФБР або лише ФБР (контрольні миші) з розрахунку 250 мкг протеїну на 1 кг маси тіла.

Схема імунізації включала 3 етапи введення часток мишам з інтервалом в 2 тижні. Через тиждень від першої імунізації проводився забір проб, який повторювався через тиждень після кожної з імунізацій.

Забір проб крові проводився з хвостової вени. Для одержання сироваток відібрану кров без актикоагулянтів інкубували протягом 40 хв при кімнатній температурі та центрифугували протягом 30 хв за 2700 об/хв. Потім сироватку відбирали та зберігалися в морозильній камері (-20°C) для подальшого аналізу.

Забір проб слини проводився з ротової порожнини. Проби слини були отримані шляхом багаторазового промивання ротової порожнини 300 мкл ФБР. Отримані проби зберігалися в морозильній камері (-20°C) для подальшого аналізу.

2.2.17. Визначення рівня антитіл до досліджуваного антигену в сироватці крові імунізованих мишей

Рівень антитіл до модельного антигену у пробах сироватки крові, отриманих з імунізованих мишей, визначали методом непрямого імуноензимного аналізу (ІЕА). У використаній модифікації ІЕА було наявно три шари: 1 шар - антиген, з яким проходила імунізація, 2 шар - сироватка крові імунізованих мишей, та 3 шар антитіл, специфічних до Fc-фрагментів IgG або IgA миші, кон'югованих з пероксидазою. Блокування можливих

місць неспецифічної сорбції проводили шляхом інкубації з розчином знежиреного молока. Всі компоненти вносили в розчині ТФБ (0,04% Tween 20 в ФБР).

На першому етапі досліду у лунки мікропланшета вносили вловлювальний шар - антиген або контрольний протеїн в ФБР з розрахунку 1 мкг на 100 мкл на лунку та інкубували 18 год при 4°C. Надалі мікропланшети промивали, додавали 1% розчин сухого знежиреного молока в ФБР та інкубували 1 год при 37°C. Мікропланшети промивали та вносили шар зразків – проби, отримані з імунізованих мишей та розчинені в ТФБ з розрахунку по 100 мкл на лунку. Внесений розчин титрували шляхом двократного розведення та інкубували мікропланшети 1 год при 37°C. Після промивки в мікропланшети вносили в ТФВ шар антитіл, специфічних до Fc-фрагментів IgG або IgA миші, кон'югованих з пероксидазою хрому, (100 мкл на лунку) та інкубували 1 год при 37°C.

Як хромогенний субстрат використовували 3,3',5,5'-тетраметилбензидин (ТМВ). ТМВ при окисленні H_2O_2 набуває блакитного кольору з максимумом поглинання на довжині хвилі 650 нм. При додаванні до розчину хромогену сульфатної кислоти ТМВ змінює колір на жовтий, що дозволяє вимірювати його оптичне поглинання при довжині хвилі 450 нм [123]. Робочий розчин ТМВ готували наступним чином: 1 частину розчину 1 мг/мл ТМВ в DMSO (диметил сульфоксид) додавали до 9 частин 0,05М цитратно-фосфатного буферного розчину (рН 5,0) та додавали H_2O_2 до концентрації 0,007%.

Після інкубації з антитілами мікропланшети промивали та вносили по 100 мкл на лунку робочого розчину ТМВ, інкубували 15 хв при 37°C. Для зупинки пероксидазної реакції, що каталізувалася пероксидазою хрому, до мікропланшетів додавали 1N розчин H_2SO_4 з розрахунку 50 мкл на лунку. Результати ІЕА зчитували на мікропланшетному рідері BioTek ELx800 (BioTek Instruments, США) за довжини хвилі 450 нм.

2.2.18. Статистична обробка отриманих результатів

Експериментальні дані обробляли загальноприйнятими методами статистики. Для оцінки кількісних показників визначали середнє значення (M) та стандартну похибку середнього (SE). Нормальність розподілу даних у групах перевіряли за допомогою W- критерію Шапіро-Уїлка. Показники вірогідності помилки першого роду менше 5% ($p \leq 0,05$) вважалися статистично достовірними. Всі математичні розрахунки проведено за допомогою стандартних пакетів комп'ютерних програм. Для розрахунку та графічної презентації отриманих результатів були використані комп'ютерні програми Microsoft Excel та Origin 8.0.

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

РОЗДІЛ 3

ХАРАКТЕРИСТИКА ФІЗИЧНИХ, МОРФОЛОГІЧНИХ, ЦИТОТОКСИЧНИХ ТА АД'ЮВАНТНИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ ЧАСТОК РІЗНОГО ПОХОДЖЕННЯ З ІММОБІЛІЗОВАНИМ ФРАГМЕНТОМ ДИФТЕРІЙНОГО ТОКСОЇДУ

Для використання комплексів часток з антигеном для пероральної імунізації вони повинні бути стабільними: не руйнуватися під дією ушкоджуючих факторів ШКТ, та не деградувати протягом тривалого часу зберігання. Окрім цього, обов'язковими факторами є здатність до проникнення через бар'єри слизових оболонок, взаємодія з клітинами імунної системи та індукція довгострокової імунної пам'яті. Частки не повинні чинити цитотоксичний вплив на клітини організму та не впливати на антигенну структуру іммобілізованого антигену.

Використовуючи різні підходи та методи синтезу, нами було отримано 5 типів часток різної хімічної природи та розміру з іммобілізованим рекомбінантним фрагментом дифтерійного токсоїду виходячи з різних фізико-хімічних властивостей та здатності до біодеградації одержаних комплексів. Усі кон'югати перевірено на здатність до взаємодії з антиген-презентувальними клітинами, оцінено цитотоксичний вплив та імуногенні властивості.

3.1 Отримання рекомбінантного антигену

В якості цільового антигену для проведення імунізації було використано рекомбінантне похідне субодиниці В дифтерійного токсоїду EGFP-SubB. Наявність флуоресцентного протеїна у конструкції рекомбінантного похідного субодиниці В суттєво стабілізувала отриманий рекомбінантний

протеїн, та покращувала його сорбційні властивості. Експресований в клітинах *E.coli* протеїн EGFP-SubB знаходився переважно у нерозчинній фракції, тому його переводили у розчинну форму та виділяли на колонці з афінним сорбентом Ni-NTA агарозою шляхом поступового зменшення концентрації сечовини. Рекombінантний протеїн був здатний зв'язуватись з рецепторами дифтерійного токсину (ДТ) на поверхні клітин-«мішеней», але на відміну від природного ДТ, не володів токсичними властивостями. Для сорбції на частинки використовувався протеїн EGFP-SubB, результати виділення якого представлені на електрофореграмі (рис. 3.1, Б).

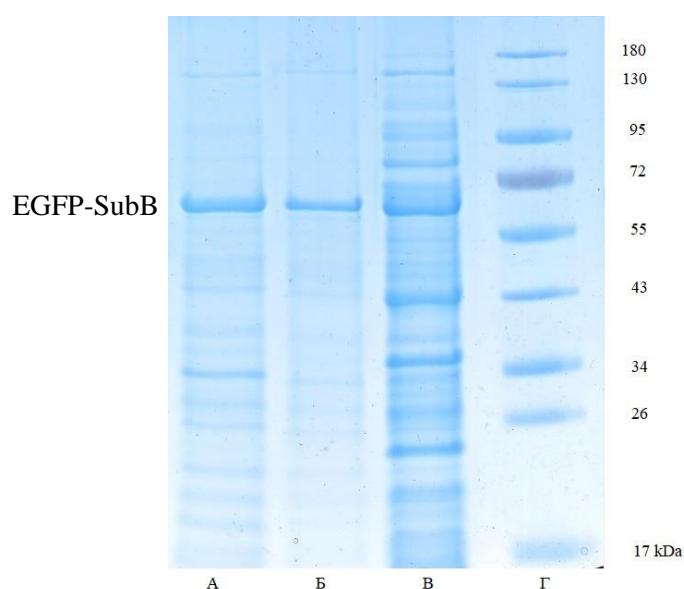


Рисунок 3.1. Електрофореграма протеїнових фракцій, елюйованих з колонки із сорбентом Ni-NTA агароза: А,Б – фракції елюату EGFP-SubB після ренатурації; В– лізат бактеріальних клітин, що містить протеїн EGFP-SubB; Г – маркерні протеїни.

3.2 Характеристика комплексів часток різної хімічної природи та розміру з іммобілізованим рекombінантним похідним субодиниці В дифтерійного токсиду.

3.2.1 Визначення ефективності навантаження часток рекомбінантним похідним субодиниці В дифтерійного токсоїду

Для перевірки ад'ювантних властивостей та вибору оптимальних носіїв антигенів при їхньому використанні для *per os* вакцинацій було отримано комплекси часток різного розміру та хімічної природи, на які було іммобілізовано антиген – EGFP-SubB.

Було синтезовано два типи наночасток на основі золота. При синтезі ми спирались на розроблені нами раніше методики, поставивши за мету отримати наночастки двох розмірів, що за літературними даними мають різні ад'ювантні та цитотоксичні властивості. Відтак, за рахунок зміни концентрацій ключових компонентів для синтезу часток золота ми отримали комплекси середнього (Gold 1) та великого (Gold 2) розмірів.

В даній роботі були використані частки і на основі фосфату кальцію (CaP). Оскільки дані частинки можуть розчинятися в організмі, протеїн іммобілізований на таких частках буде з часом доступний для розпізнавання в організмі.

Частинки на основі полі(D,L-лактид-ко-гліколіду) (PLGA), як і частки CaP, є біорозчинними та біосумісними. Оскільки протоколи синтезу часток на основі PLGA не достатньо оптимізовані, важливо було дослідити, як метод синтезу даних частинок впливає на їхні розміри, форму та здатність до іммобілізації антигену. Отже, частинки готувалися за двома методами: перший базувався на методі заміщення розчинника з подальшим випаровуванням органічної фази – утворювались частинки PLGA 1, а другий включав подвійну емульсифікацію з подальшим випаровуванням органічної фази – утворювались частинки PLGA 2. Після синтезу на такі частинки іммобілізувався антиген.

На першому етапі досліджень синтезовані частки з іммобілізованим на них антигеном EGFP-SubB аналізували на ефективність його включення, адже саме ця характеристика є ключовою для розрахунку дози препарату та

може мати вплив на його імуногенність (табл. 3.1). Ефективність іммобілізації (EI) протеїнового антигену оцінювали за допомогою методу електрофоретичного розділення шляхом порівняння концентрації протеїну до іммобілізації, і у зразках, що містили протеїн, який залишився незв'язаним після навантаження (надосадова рідина після центрифугування) і визначали за формулою, наведеною нижче:

$$EI (\%) = \frac{AI}{AA} \times 100$$

AA - кількість протеїну до іммобілізації (мг)

AI - кількість зв'язаного протеїну (мг)

Таблиця 3.1

Властивості отриманих часток

Вид часток \ Властивості	Gold 1	Gold 2	CaP	PLGA 1	PLGA 2
Середній розмір (нм)	9	16	37	35	100
Загальна маса синтезованих часток, мг	2,5	2,5	12,7	46	30
Маса доданого протеїну, мкг	670	780	210	150	400
Маса іммобілізованого на частках протеїну, мкг	159	208	188	70	149
Середня ефективність включення антигену (мкг/мг наночасток)	63,5	83	14,9	1,5	4,9
Ефективність іммобілізації (EI), %	24	27	89	47	37
Навантаження часток (НЧ), %	6,4	8,3	1,5	0,2	0,5

Найбільшу ефективність іммобілізації протеїну продемонстрували частки CaP, що сорбували на собі практично 90% доданого протеїну. Частки PLGA 1

та PLGA 2 мали дещо менші значення (47% та 37% відповідно), а от найнижчу ефективність включення антигену продемонстрували частки Gold 1 та Gold 2 (24% та 27% відповідно).

Визначали також і навантаження часток (табл. 3.1). Розрахунки проводили за формулою, наведеною нижче:

$$\text{НЧ (\%)} = \frac{\text{АІ}}{\text{АМ}} \times 100$$

АІ - кількість зв'язаного протеїну (мг)

АМ – кількість синтезованих часток (мг)

За характеристикою навантаження часток найкращі результати продемонстрували частки Gold 1 та Gold 2 (6,35% та 8,30% відповідно), а от найнижчі значення відмічено для PLGA 1 та PLGA 2 часток (0,15% та 0,50% відповідно). НЧ для часток CaP мали проміжні значення між Gold та PLGA.

Така відмінність між ефективністю іммобілізації та навантаженням часток може пояснюватись різницею у розмірах часток, а відповідно і площею зв'язування антигену. Саме тому наступним етапом характеристики часток було дослідження їхніх розмірів та форми.

3.2.2 Характеристика морфології отриманих часток різної хімічної природи та розміру

Іншим важливим фактором при створенні пероральних вакцин є форма та розмір часток, оскільки ці властивості впливають на їхнє поглинання імунними клітинами. Як видно з електронних мікрофотографій (рис. 3.2), усі синтезовані частки мали симетричну округлу форму, при цьому частки, створені на основі золота, мали найменші розміри у порівнянні з частками CaP та PLGA (табл. 1).

При синтезі часток на основі золота ми спирались на розроблені раніше методики, де розміри часток залежать від концентрацій компонентів реакційної суміші, поставивши за мету отримати частки двох різних розмірів.

За результатами електронної мікроскопії середній розмір частинок, синтезованих за методикою 1, склав близько 9 нм, при цьому частинки в цілому мали округлу правильну форму (рис. 3.2, А). Частинки, синтезовані за методикою 2, мали середній розмір близько 16 нм, але на мікрофотографіях можна помітити як поодинокі частинки, так і утворення, які, швидше за все, відповідають об'ємним скупченням окремих частинок, що екранують одна одну, тому при розрахунку середніх розмірів зважали лише на діаметр поодиноких частинок (рис. 3.2, Б). В цілому ж, дані електронної мікроскопії підтвердили, що нам вдалось синтезувати два види наночастинок на основі золота, кон'югованих цільовим антигеном, які суттєво відрізняються за розміром. Отже, при подальших дослідженнях можливості використання таких наночастинок для пероральної імунізації, можна буде оцінити як впливає розмір часток на їхні властивості.

Створені на основі фосфату кальцію частки також мали симетричну круглу форму, проте виявились дещо більшими, а їхній середній розмір склав близько 37 нм (рис. 3.2, В).

Для отримання часток на основі PLGA нами було використано 2 різні підходи. Як видно з мікрофотографій цих часток на рисунку 3.2, синтезовані за різними методами частинки мали схожий розмір, хоча використання методу 2 давало більш гомогенні частинки порівняно з частинками синтезованими за методом 1. Так, використання методу подвійної емульсифікації з подальшим випаровуванням органічної фази (PLGA 2) давало більш гомогенні частки, середній розмір яких склав 35 нм (рис. 3.2, Г), тоді як середній розмір часток, синтезованих шляхом заміщення розчинника з подальшим випаровуванням органічної фази (PLGA 1), становив 100 нм (рис. 3.2, Д).

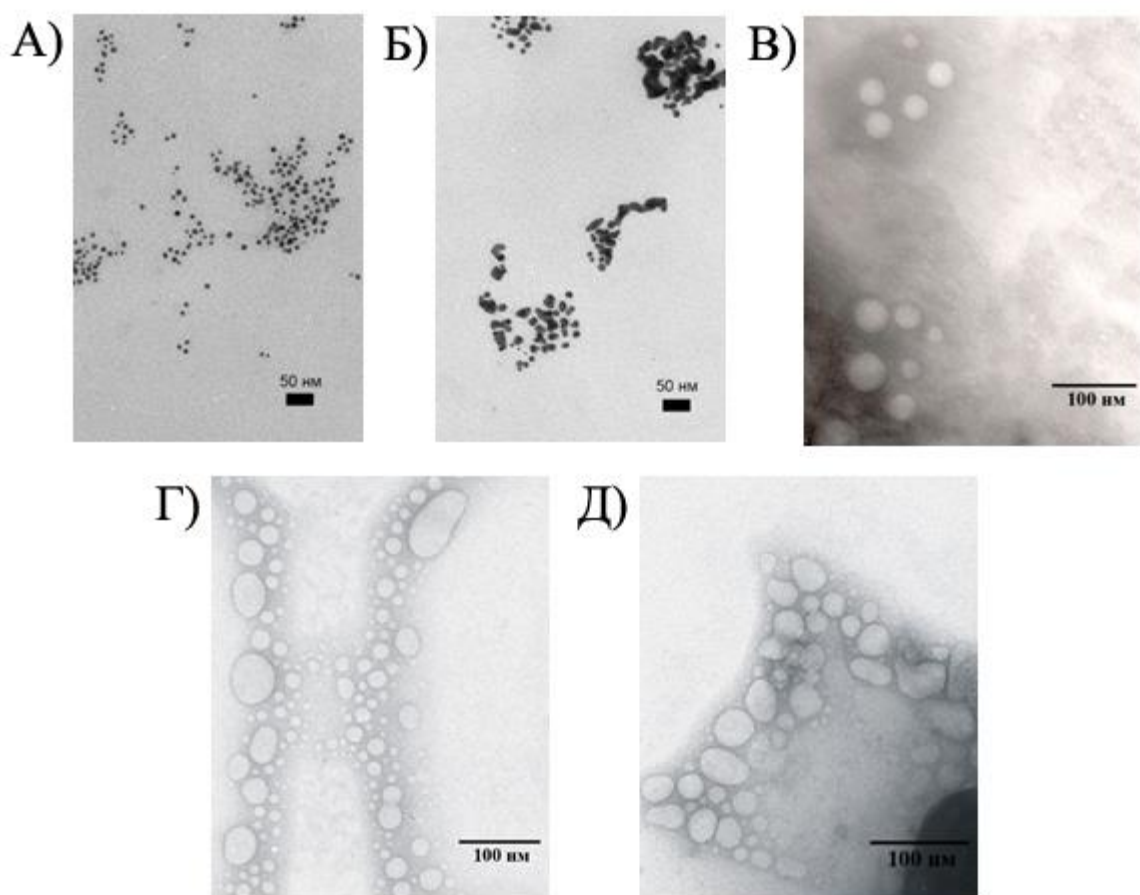


Рисунок 3.2. Електронні мікрофотографії часток створених на основі золота: Gold 1 (А) та Gold 2 (Б); фосфату кальцію CaP (В), та полі(D,L-лактид-ко-глюколід): PLGA 1 (Г) та PLGA 2 (Д).

3.3 Дослідження цитотоксичних властивостей одержаних часток різної хімічної природи *in vitro*.

Для використання синтезованих часток як ад'ювантів за пероральної імунізації обов'язковим етапом є перевірка їхньої токсичності до різних клітин організму. Визначення цитотоксичного впливу часток CaP, PLGA 1, PLGA 2, Gold 1 та Gold 2 на клітини проводили за допомогою МТТ-тесту. До попередньо нарощених клітин ліній L929 та U937 додавали частки в концентраціях 0,1-25 мкг/мл. Надалі клітини інкубували протягом 12 годин, після чого проводився ММТ тест на життєздатність клітин.

Використання у досліді клітин ліній L929 та U937 було обумовлено їхніми властивостями. Так, клітини лінії U937 мають властивості моноцитів, а отже володіють підвищеною здатністю до фагоцитозу, а L929 мають властивості клітин фібробластів, тобто є нефагоцитарними клітинами.

Результати впливу часток на клітини ліній L929 та U937 подано відповідно на рисунках 3.3 та 3.4. За 100 % на гістограмах було взято кількість життєздатних контрольних клітини, що інкубувались за таких само умов без додавання часток.

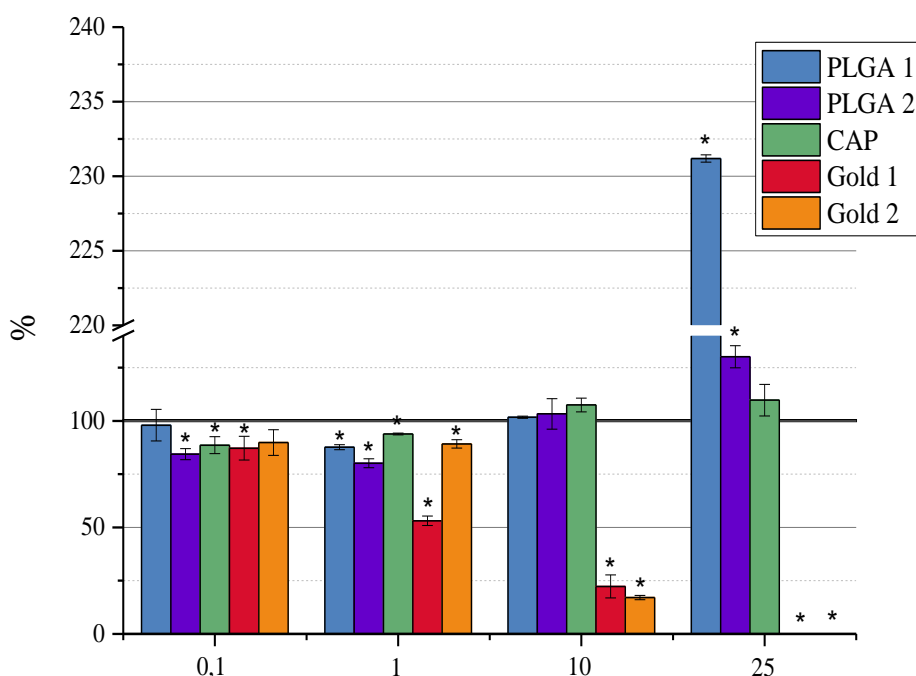


Рисунок 3.3. Життєздатність клітин лінії L929 після інкубації 12 год з частками CaP, PLGA 1, PLGA 2, Gold 1 та Gold 2 доданих в концентраціях 0,1, 1, 10 та 25 мг/мл. За 100% прийнято кількість контрольних клітин, що інкубувались без додавання наночасток ($M \pm SE$, $n=4$).

* $P \leq 0.05$ у порівнянні з контрольною групою клітин, що інкубувались без додавання часток.

Похідні PLGA не мали вираженого токсичного ефекту на ці клітини. Так частинки PLGA 1 в концентраціях 0,1-10 мг/мл (рис. 3.3) не впливали

суттєво на життєздатність клітин L929, але в концентрації 25 мкг/мл їхня кількість збільшувалась приблизно до 225% порівняно з контролем. Частинки PLGA 2 навпаки пригнічували ріст клітин приблизно на 20% в концентраціях 0,1 та 1 мг/мл, проте при збільшенні концентрації до 10 та 25 мг/мл кількість клітин зростала до 100% та 125% відповідно. Ефект PLGA 1 на U937 (рис. 3.4) полягав у зменшенні їхньої кількості до близько 80% від контролю у діапазоні концентрацій 0,1-25 мг/мл. Аналогічний ефект спостерігався і для PLGA 2, проте у діапазоні 0,1-10 мг/мл інгібування росту складало близько 30%, але при додаванні 25 мг/мл таких частинок їхній інгібіторний вплив зменшувався до 20%.

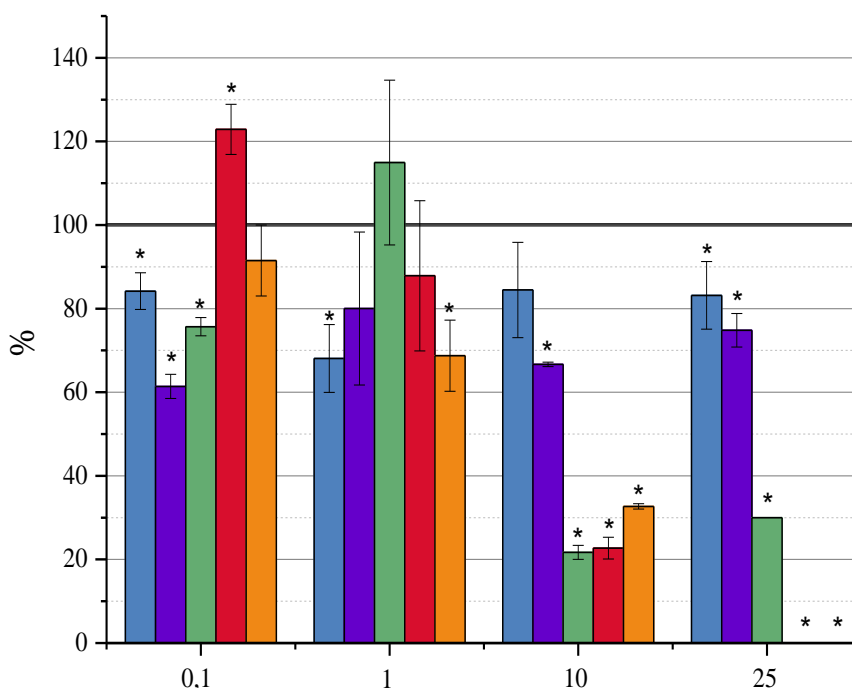


Рисунок 3.4. Життєздатність клітин лінії U937 після інкубації 12 год з наночастками CaP, PLGA 1, PLGA 2, Gold 1 та Gold 2 доданих в концентраціях 0,1, 1, 10 та 25 мг/мл. ($M \pm SE$, $n=3$).

* $P \leq 0,05$ у порівнянні з контрольною групою клітин, що інкубувалися без додавання часток.

Таким чином для частинок з PLGA дозозалежного цитотоксичного впливу показано не було, проте був наявний певний інгібіторний вплив на ріст клітин, що ймовірно пов'язаний зі зменшенням площі росту клітин при додаванні цих часток. Стимулюючий вплив PLGA 1 у високих концентраціях ймовірно є артефактом, оскільки при таких концентраціях утворювався значний осад з часток, який міг впливати на результати вимірювання.

Частки CaP незначно знижували життєдіяльність клітин L929 на 10-15% в діапазоні концентрацій 0,1-1 мг/мл, проте в діапазоні концентрацій 10-25 мг/мл кількість клітин відновлювалася до 100-110%. А от вплив на клітини лінії U937 мав дозозалежний ефект, так в концентрації 0,1 мг/мл CaP знижували життєдіяльність клітин на 20%, проте високі концентрації часток знижували кількість клітин до 20-30% від контролю.

Отже, частки CaP не проявляли значного інгібіторного впливу на ріст клітин фібробластів, при цьому позитивний вплив високої концентрації 10-25 мг/мл цих частинок на ріст клітин можливо пояснити також, як і у випадку з PLGA частками, ускладненням визначенням життєздатності клітин через їхній високий вміст в лунках. Варто відзначити, що CaP виявилися токсичними для макрофагоподібних клітин лінії U937 починаючи з концентрації 10 мг/мл. Такий ефект часток CaP може бути пов'язаний з різним типом клітин, що може зумовлювати різну відповідь клітин на дію таких часток.

Наночастки Gold 1 та Gold 2 виявили дозозалежний цитотоксичний вплив в МТТ тесті як для клітин лінії L929 (рис. 3.3), так і для клітин лінії U937 (рис. 3.4). Ці частки, починаючи з концентрації 1 мг/мл, знижували життєздатність обох типів клітин. Так Gold 1 знижували життєздатність клітин лінії L929 на 50%, а Gold 2 – на 20%, а для клітин лінії U937 наночастки Gold 1 знижували життєздатність на 10%, та Gold 2 – на 30%. При збільшенні концентрації цих частинок в 10 разів, вони знижували життєдіяльність клітин ліній L929 та U937 на 70-80%.

Отже, в ході досліджень впливу частинок на життєздатність клітин лінії L929 та U937 методом ММТ тесту було показано дозозалежну токсичність наночасток Gold 1 та Gold 2 для обох типів клітин, а також CaP для макрофагальних клітин U937. Частилки на основі PLGA суттєвого цитотоксичного ефекту у досліджуваних концентраціях не виявили, проте продемонстрували незначний вплив на ріст клітин в культурі, який, ймовірно, пов'язаний зі значним об'ємом, який займали дані частки в інкубаційному середовищі.

3.3.1 Визначення концентрацій напівмаксимального інгібування (IC_{50}) для часток з встановленим цитотоксичним ефектом.

Надалі було проведено розрахунки концентрацій напівмаксимального інгібування IC_{50} для часток, що володіли цитотоксичним впливом, за допомогою аналізу графіків інгібування росту клітин. Результати такого моделювання подано на рисунку 3.5.

З отриманих даних видно, що Gold 1 максимально інгібували ріст клітин L929 починаючи з концентрації 1,2 мг/мл, а Gold 2 – 3 мг/мл, для клітин U937 наночастки Gold 1 та Gold 2 максимально інгібували ріст починаючи з концентрації 3 мг/мл, а CaP – 12,5 мг/мл.

З метою визначення концентрацій напівмаксимального інгібування часток Gold 1 та Gold 2 для клітин ліній L929 та U937, а також CaP для клітин лінії U937, експериментальні дані подані на рисунку 3.5 було проаналізовано за допомогою програмного забезпечення для аналізу графічних даних SigmaPlot. Застосований метод полягає у ітеративному підборі для отриманих точок констант: життєздатності клітин без впливу інгібітора росту (min), життєздатності клітин при максимальній концентрації інгібітора (max) та концентрацій напівмаксимального інгібування (IC_{50}). Цифрові значення отриманих констант подані в табл. 3.2.

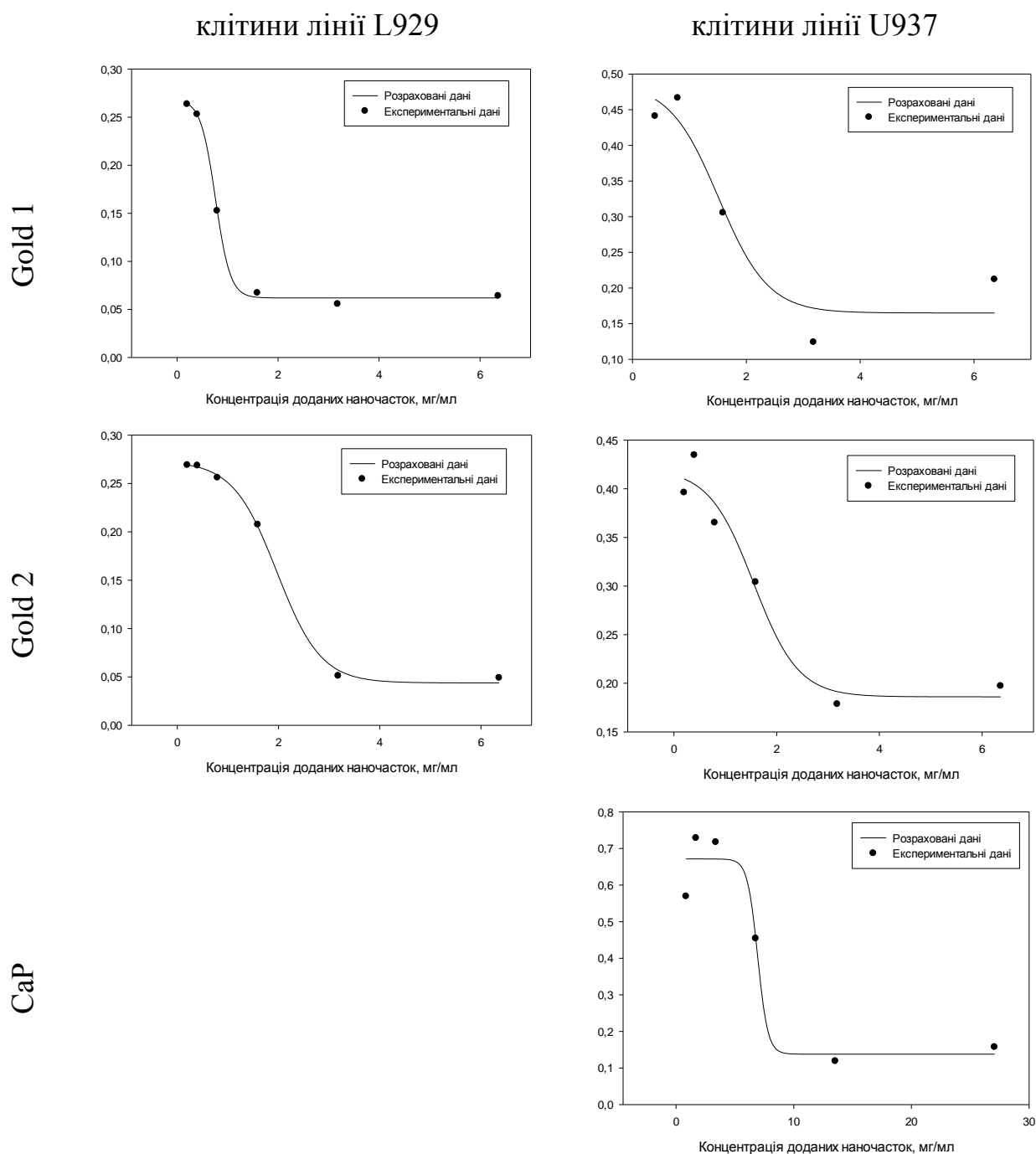


Рисунок 3.5. Залежності життєздатності клітин лінії L929 після інкубації 12 год з наночастками Gold 1 та Gold 2 та клітин лінії U937 після інкубації 12 год з наночастками CaP, Gold 1 та Gold 2, доданих в різних концентраціях: точки на графіку представляють експериментальні дані, отримані в МТТ тесті, лінії – теоретичні апроксимації точок на сигмоїдальні криві виживання клітин розраховані за допомогою програмного забезпечення SigmaPlot.

Розраховані константи цитотоксичного впливу наночастинок Gold 1, Gold 2 та CaP на клітини ліній L929 та U937.

Частки	Gold 1			Gold 2			CaP		
Константи Клітинні лінії	<i>min</i> , ум.од.	<i>max</i> , ум.од.	<i>IC₅₀</i> , мг/мл	<i>min</i> , ум.од.	<i>max</i> , ум.од.	<i>IC₅₀</i> , мг/мл	<i>min</i> , ум.од.	<i>max</i> , ум.од.	<i>IC₅₀</i> , мг/мл
L929	0,27	0,04	1,97	0,27	0,06	0,76	н.в.	н.в.	н.в.
U937	0,49	0,17	1,51	0,42	0,19	1,55	0,67	0,14	6,93

Прим. «н.в.» – константи не визначалися.

Виходячи з отриманих даних, можна відзначити схожість значень IC_{50} для обох типів часток Gold 1 та Gold 2 та відмітити їх значний цитотоксичний вплив на фагоцитарні клітини лінії U937, що виявився майже у 5 разів більший у порівнянні з частками CaP. Вплив часток золота на клітини лінії L929 дещо відрізнявся, що проявилось у токсичності часток Gold 2, що майже втричі перевищувала вплив часток Gold 1.

3.3.2 Визначення шляху загибелі клітин ліній L929 та U937 при дії токсичних доз часток Gold 1, Gold 2, CaP

Дослідження шляху загибелі клітин базується на визначенні структурних особливостей клітин, що дозволяє виявляти загибель клітин на ранніх етапах, коли зміни у функціонуванні клітин майже не помітні. Так, одним із ранніх маркерів апоптичної загибелі клітини є втрата асиметрії мембрани, яка виражається у виході фосфатидил серину з внутрішньоклітинної сторони плазматичної мембрани на зовнішньоклітинну сторону, що можливо відслідкувати з використанням специфічного

фосфатидил серин-зв'язувального протеїну Анексину V. Некротична загибель пов'язана, переважно, з втратою цілісності мембрани, яку також можливо виявити з використанням барвників, що проникають лише через пошкоджену мембрану, наприклад етидїй бромїду. Отже, комбіноване використання етидїй бромїду та Анексин V дозволяє визначати шлях загибелї клітини, навіть якщо вона знаходиться на ранніх етапах цього шляху. Тому для визначення шляхів загибелї клітин ліній L929 та U937 при дії токсичних доз часток Gold 1, Gold 2, CaP використовували суміш маркерів етидїй бромїд та Анексин V. Визначення проводили на протоковому цитофлуориметрі, де визначали параметри флуоресценції кожної клітини забарвленої маркерами. Клітини, що не були забарвленими жодним з маркерів, вважалися живими; клітини, що були забарвленими лише Анексином V, вважалися такими, що знаходяться на шляху апоптичної загибелї; а клітини, що були забарвленими етидїй бромїдом та Анексином V, вважалися такими, що знаходяться на шляху некротичної загибелї.

На рисунку 3.6 подані гістограми, що відображають шлях загибелї клітин лінії L929 при дії токсичних доз Gold наночастинок. Наночастки Gold 1 та Gold 2 у концентраціях 7 мг/мл призводили до загибелї 45% досліджуваних клітин. Серед шляхів загибелї чітко видно залежність між розміром частинок та шляхом загибелї клітин, так наночастки Gold 1, що мали розміри близько 9 нм, викликали некротичну загибель майже у двох третин від клітин, що загинули, проте більші за розміром наночастки Gold 2 викликали некротичну загибель лише у третини клітин, що загинули.

Шляхи загибелї клітин лінії U937, що викликані дозами 7 мг/мл наночастинок Gold 1, Gold 2, а також дозами 27 мг/мл часток CaP показані на рисунку 3.7. Майже 70% клітин загинуло при дії вищенаведених концентрацій часток. Як і у випадку для клітин лінії L929, Gold 1 викликали апоптоз у меншій кількості клітин порівняно з дією Gold 2. Варто відмітити, що більша частина клітин лінії U937 при дії Gold 1 та Gold 2 гинула шляхом некрозу. Проте, ефективними стимуляторами апоптозу клітин лінії U937

виявилися частинки CaP, які викликали загибель 50% шляхом апоптозу, при 60% від загальної кількості загиблих клітин.

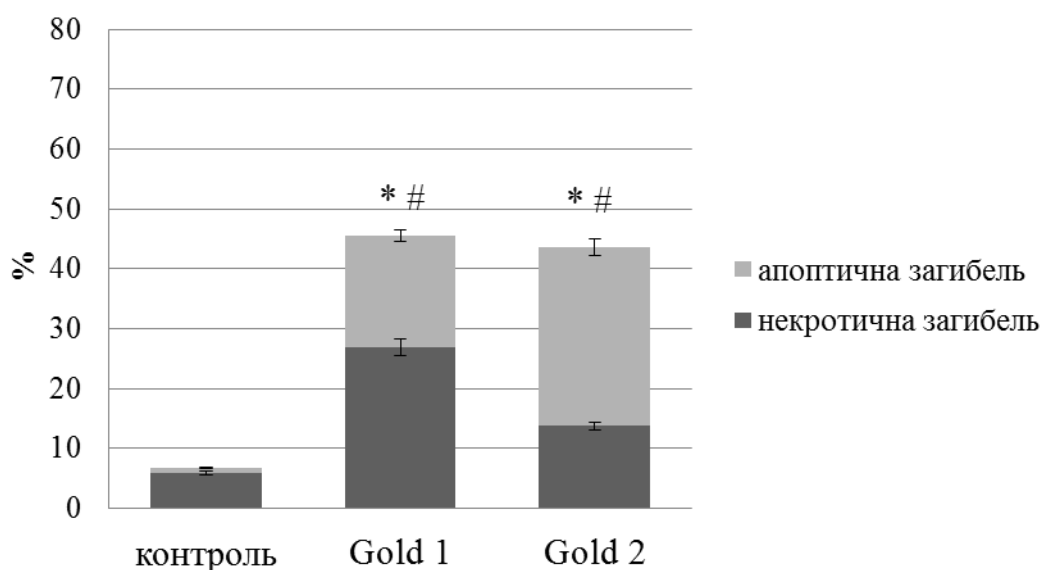


Рисунок 3.6. Загибель клітин лінії L929 за дії токсичних доз часток Gold 1 (7 мг/мл) та Gold 2 (7 мг/мл). ($M \pm SE$, $n=5$).

* $P \leq 0,05$ апоптическая загибель клітин у порівнянні з контрольною групою клітин, що інкубувалися без додавання часток.

$P \leq 0,05$ некротическая загибель клітин у порівнянні з контрольною групою клітин, що інкубувалися без додавання часток.

Таким чином, в ході дослідження шляхів загибелі клітин ліній L929 та U937 виявлено, що наночастки Gold 1 викликають переважно некроз у культурі обох клітин, в той час як наночастки Gold 2 викликають переважно некроз у U937, але їхній ефект для L929 виражається переважно у індукції апоптической загибелі клітин. Для обох типів клітин для золотих наночасток показана залежність між розміром наночасток та їхньою здатністю викликати апоптоз у культурі. Наночастки CaP показали також високу здатність викликати апоптическую загибель клітин лінії U937

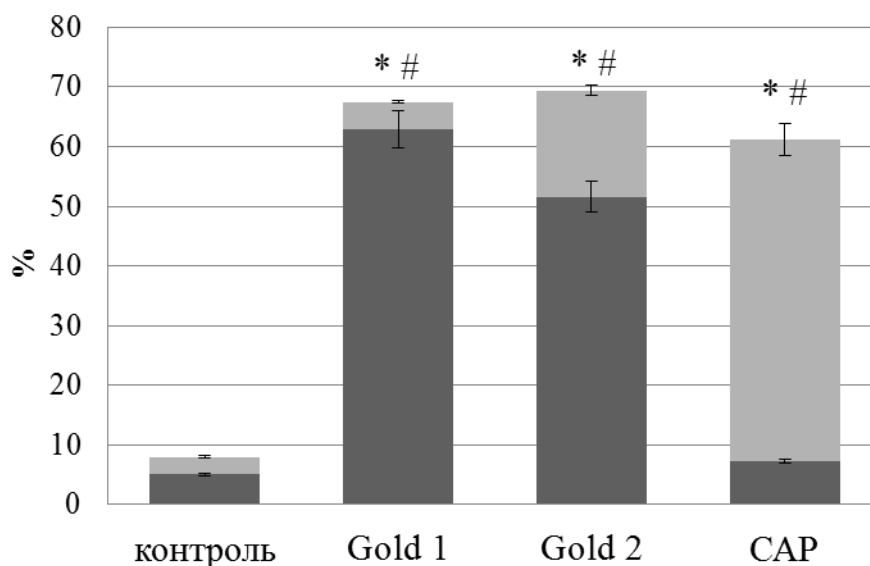


Рисунок 3.7. Загибель клітин лінії U937 за дії токсичних доз часток Gold 1 (7 мг/мл), Gold 2 (7 мг/мл) та CaP (27 мг/мл). ($M \pm SE$, $n=5$).

* $P \leq 0,05$ апоптична загибель клітин у порівнянні з контрольною групою клітин, що інкубувалися без додавання часток.

$P \leq 0,05$ некротична загибель клітин у порівнянні з контрольною групою клітин, що інкубувалися без додавання часток.

3.4 Дослідження процесів взаємодії одержаних часток різної хімічної природи та розміру з антиген-презентувальними клітинами *in vitro*

3.4.1 Дослідження ефективності взаємодії одержаних часток різної хімічної природи з клітинами лінії J774 методом протокової цитометрії.

Для виявлення закономірностей прояву ад'ювантних властивостей наночасток, як носіїв антигенів було досліджено процеси їхньої взаємодії з антиген-презентувальними клітинами *in vitro*. Для проведення дослідження було використано макрофагоподібні клітини лінії J774, що походять з гістіоцитарної саркоми мишей. В якості позитивного контролю на

фагоцитарну активність клітин J774 використовували бактерії *E. coli*, що містили в собі флуоресцентний протеїн EGFP.

Для дослідження ефективності сорбції часток та контрольних бактерій на поверхні клітин проводили їх інкубацію протягом 15 хв при 4°C, в той час як інкубація за температури 37°C дозволяла дослідити ефективність поглинання часток протягом певного періоду часу.

З результатів цитофлуориметричного дослідження (рис. 3.8) видно, що майже усі частки були здатні до сорбції на поверхні клітин, а фагоцитарна активність клітин продемонструвала певну залежність по відношенню до їхньої сорбційної здатності.

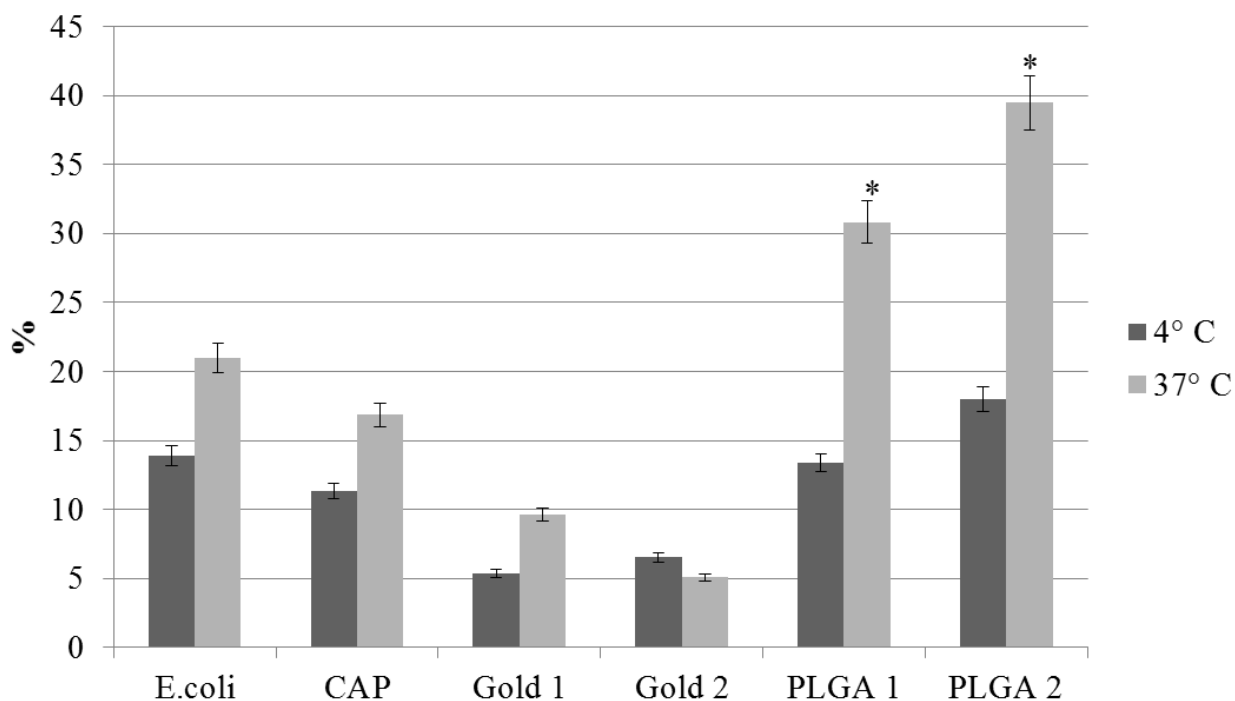


Рисунок 3.8. Взаємодія клітин лінії J774 з частками CaP, Gold 1, Gold 2, PLGA 1 та PLGA 2, а також бактеріями *E. coli* у якості позитивного контролю за температури 4°C та 37°C. ($M \pm SE$, $n=5$).

* $P \leq 0,05$ у порівнянні з контрольними значеннями взаємодії клітин лінії J774 з бактеріями *E. coli*.

В контрольному зразку бактерії сорбувалися на 13% клітин, CaP – на 11%, Gold 1 – на 5%, Gold 2 – на 7%, PLGA 1 – на 13%, PLGA 2 – на 18%. Видно, що результати досліджень сорбції часток PLGA обох типів достовірно перевищували значення, отримані від взаємодії клітин з бактеріями *E. coli*. Найнижчі результати продемонстрували частки Gold 1 та Gold 2.

Аналіз фагоцитарної активності клітин показав наступні результати: бактерії *E. coli* поглинались 21% макрофагальних клітин, CaP – 17%, Gold 1 – 10%, Gold 2 – 5%, PLGA 1 – 31%, PLGA 2 – 40%. Залежність залишилася досить схожою на сорбційну, окрім проб з наночастками на основі золота; частки Gold 1, незважаючи на невисоку сорбцію, успішно фагоцитувалися клітинами, в той час як для часток Gold 2 змін у часі помічено не було. Найкращі результати продемонстрували частки PLGA обох типів, фагоцитоз яких перевищував показники поглинання *E. coli* у 1,5 рази для PLGA 1 та у 2 рази для PLGA 2. Найнижчі показники отримані для часток Gold 1 та Gold 2.

3.4.2 Дослідження динаміки поглинання клітинами лінії J774 одержаних часток різної хімічної природи методом протокової цитометрії

З метою підвищення чутливості детекції часток, вони були кон'юговані з флуоресцентною міткою FITC, що має майже в 10 разів вищий квантовий вихід порівняно з EGFP. Дана модифікація дозволила провести дослідження щодо визначення часових особливостей поглинання часток клітинами лінії J774. Варто відмітити, що залежність між ефективністю поглинання часток, мічених FITC та EGFP, була досить схожою.

Згідно графіку, що відображає динаміку поглинання часток (рис. 3.9), майже для всіх зразків для досягнення максимуму поглинання клітинами було достатньо інкубації протягом 1 год. Найбільш виражене поглинання

було зафіксовано для часток PLGA 2, а найменш виражене – для Gold 1 та Gold 2, що підтверджує отримані раніше дані, представлені на рис. 3.8.

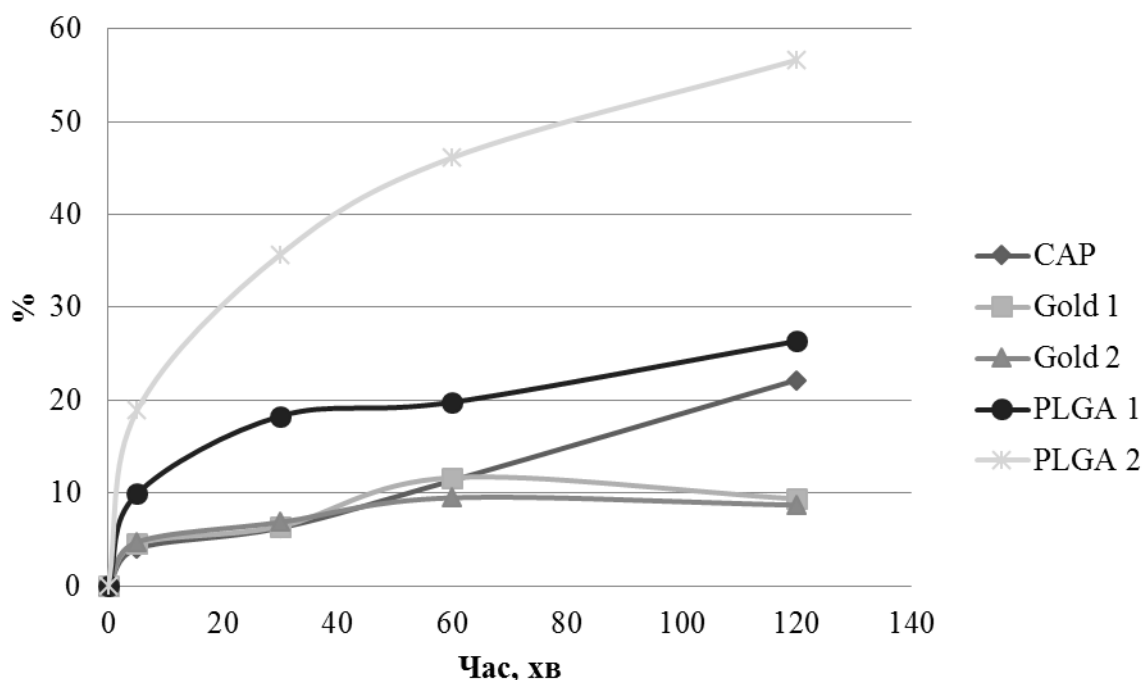


Рисунок 3.9. Динаміка поглинання часток CaP, PLGA 1, PLGA 2, Gold 1 та Gold 2 макрофагальними клітинами лінії J774.

Протягом другої години експерименту комплекси часток Gold 1 та Gold 2 з антигеном, ймовірно, поступово деградували в клітинах, про що свідчить зниження флуоресцентного сигналу; макрофагальні клітини продовжували поглинати незначну кількість часток PLGA 1 та PLGA 2 (спостерігалось незначне збільшення сигналу); лише частки CaP мали потенціал для подальшого поглинання (спостерігалось лінійне зростання сигналу). Отже кон'югати часток різної хімічної природи з рекомбінантним протеїном дифтерійного токсоду мали схожий характер динаміки поглинання, але більшість з них були ефективно поглинуті клітинами протягом 1 години інкубації.

3.4.3 Дослідження ефективності взаємодії одержаних часток різної хімічної природи з клітинами лінії J774 методом конфокальної мікроскопії.

Для підтвердження даних щодо поглинання часток макрофагоподібними клітинами, було проведено дослідження з використанням методу конфокальної мікроскопії, що дозволяє визначити локалізацію комплексів часток з флуоресцентною міткою у клітинах. Окрім наночасток до клітин додавався флуоресцентний ДНК-барвник Hoechst 33342 для контрастування клітинних ядер.

Контрольні клітини, до яких не додавали частки та бактерії, не мали флуоресценції в зеленій області спектру при даних налаштуваннях конфокального мікроскопа. В ролі позитивного контролю на фагоцитарну активність клітин J774 знову ж таки використовували бактерії *E. coli*, що містили в собі флуоресцентний протеїн EGFP

Клітини поглинали бактерії *E. coli* гірше при 4°C, ніж при 37°C. Схожа залежність була відмічена і для часток Gold 1, PLGA 1 та PLGA 2. Частки Gold 2 відрізнялися від інших видів часток за характером взаємодії з клітинами: вони добре зв'язувались з клітинами при 4°C але протягом 1 години інкубації за температури 37°C кількість часток, що взаємодіяли з клітинами, помітно зменшувалася. Подібні дані були отримані і в експериментах з використанням протокового цитометра (рис. 3.8). Також цікавим виявився характер взаємодії часток CaP з клітинами: при інкубації протягом 1 години за температури 37°C спостерігалось посилення їхньої взаємодії з клітинами, однак, вірогідно, що частки не проникали всередину клітин, а лише зв'язувались з їхньою поверхнею, як і частки Gold 2.

Як можна бачити з результатів дослідження, клітинами лінії J774 найактивніше фагоцитувались частки PLGA 2 та PLGA 1, дещо гірше бактерії та частки Gold 1 (рис. 3.10). Отримані результати співпадають з результатами цитометричного дослідження.

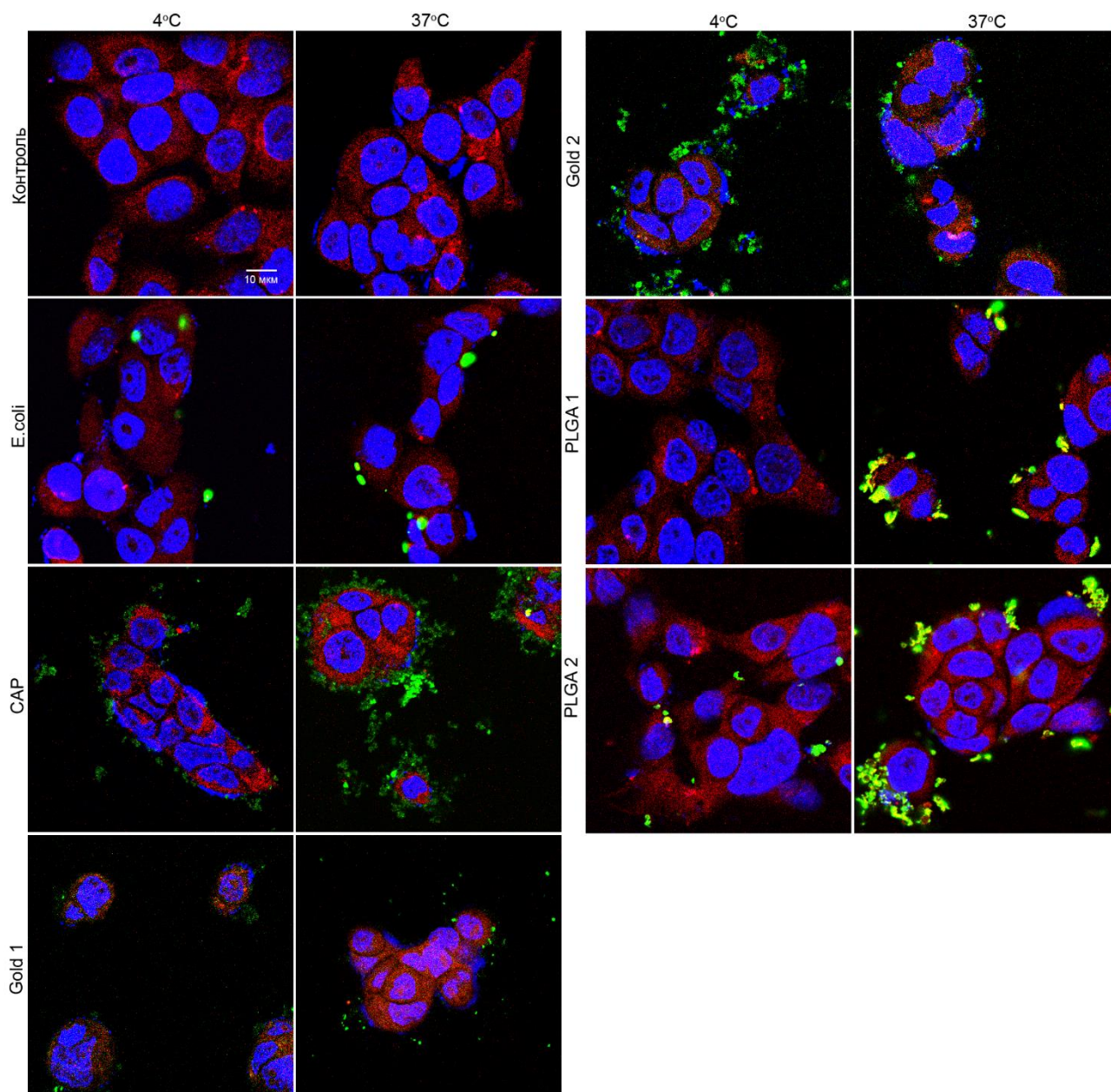


Рисунок 3.10. Взаємодія макрофагальних клітин лінії J774, що інкубувалися з частками CaP, PLGA 1, PLGA 2, Gold 1, Gold 2 або бактеріями *E.coli* у якості позитивного контролю, за температури 4°C та 37°C: зеленим кольором позначені частки або бактерії, синім – ядра клітин, червоним – автофлуоресценція клітин у каналі LP 560 нм, жовтим – частки або бактерії що поглинулися клітинами (накладання червоного та зеленого кольорів).

3.5 Дослідження імуногенних властивостей одержаних часток різної хімічної природи та розміру *in vivo*.

Для визначення здатності кон'югатів часток з антигеном формувати специфічну імунну відповідь проти введеного антигену за пероральної імунізації було проведено імунізацію *per os* експериментальних тварин та досліджено вміст специфічних до антигену сироваткових антитіл класу G, що забезпечують тривалий гуморальний імунітет, та специфічних антитіл класу A, що формують місцевий імунітет слизових оболонок.

3.5.1 Визначення титрів антитіл класу G проти антигену, іммобілізованого на отриманих частках у сироватці крові імунізованих тварин.

Для аналізу вмісту у сироватці крові специфічних антитіл проти SubB, в якості антигену в непрямому ІЕА використовували протеїн GST-SubB (SubB, що зшита з альтернативним тагом GST та не містить флуоресцентної мітки EGFP). Як контроль використовували сироватки тварин, яких імунізували *per os* частками, кон'югованими з EGFP, а також вільним антигеном EGFP-SubB або EGFP.

Після першої імунізації високий рівень специфічних антитіл класу G до антигену був лише у тварин, імунізованих частками PLGA 1, PLGA 2 та Gold 2, кон'югованими з EGFP-SubB (рис. 3.11, A).

У результаті другої імунізації у сироватках крові тварин, імунізованих частками PLGA_{EGFP-SubB} 1 та Gold_{EGFP-SubB} 2, також можна відмітити високий рівень специфічних антитіл класу G, проте він знизився порівняно з першою імунізацією. Важливо, що у тварин, імунізованих PLGA_{EGFP-SubB} 2, виявився відносно низький вміст специфічних IgG, ймовірно, повторна імунізація такими частками приводила до толерантності імунної системи організму до введеного антигену.

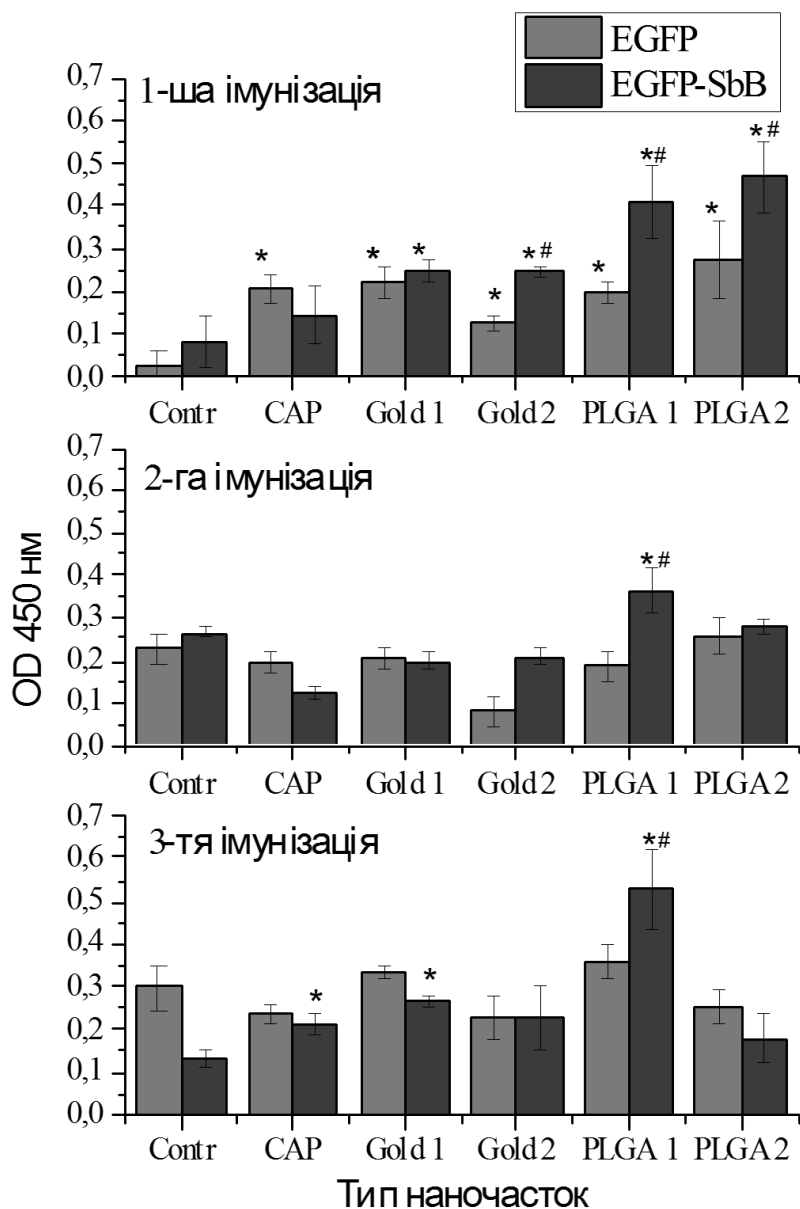


Рисунок 3.11. Гістограми, що відображають кількість антитіл класу G проти субодиниці B ДТ в сироватці крові мишей, імунованих частками з іммобілізованим антигеном – EGFP-SubB або контрольним антигеном – EGFP. ($M \pm SE$, $n=4-6$).

* $P \leq 0.05$ у порівнянні з контрольною групою імунованою антигеном EGFP-SubB,

$P \leq 0.05$ у порівнянні з контрольною групою, імунованою наночастками з іммобілізованим антигеном – EGFP.

За результатами, отриманими після третьої імунізації, майже у всіх імунізованих тварин було виявлено низький вміст IgG, специфічних до SubB. Високий рівень специфічних IgG зберігався лише у тварин, імунізованих частками PLGA_{EGFP-SubB} 1.

3.5.2 Визначення титрів антитіл класу А проти антигену, іммобілізованого на отриманих частках у сироватці крові імунізованих тварин.

Сироватки крові тварин, імунізованих частками різних типів з іммобілізованим антигеном, також аналізували на вміст специфічних до SubB антитіл класу А (рис. 3.12).

Після першої імунізації рівні IgA, специфічних до SubB, були підвищені у сироватках крові мишей, імунізованих частками CaP_{EGFP-SubB}, Gold_{EGFP-SubB} 2, PLGA_{EGFP-SubB} 1 та у групи, імунізованої вільним EGFP-SubB, в порівнянні з групами, де імунізація проходила частками, кон'югованими з EGFP.

У результаті другої імунізації рівні специфічних антитіл класу А у тварин, імунізованих вільним EGFP-SubB, залишались незмінними, проте відбулося підвищення рівня IgA у сироватках крові тварин, імунізованих PLGA_{EGFP-SubB} 1 та PLGA_{EGFP-SubB} 2. Це свідчить про те, що не дивлячись на здатність вільного антигену викликати активацію імунної відповіді слизових оболонок, кон'югація його з частками PLGA підвищує імуногенність антигену приблизно у 1,5 разів. Рівень антитіл класу А у тварин, імунізованих частками Gold_{EGFP-SubB} 2, знизився, що, ймовірно, вказує на толерантність до антигену тварин, імунізованих цими частками.

Після третьої імунізації відбулося загальне зменшення рівня антитіл класу А. Підвищений рівень IgA у порівнянні з контролем зберігався у груп, імунізованих CaP_{EGFP-SubB}, PLGA_{EGFP-SubB} 1 та PLGA_{EGFP-SubB} 2, проте, зразки сироватки крові мишей, імунізованих CaP, мали високий рівень

неспецифічних антитіл. Таке зниження говорить про можливу толерантність до введеного антигену.

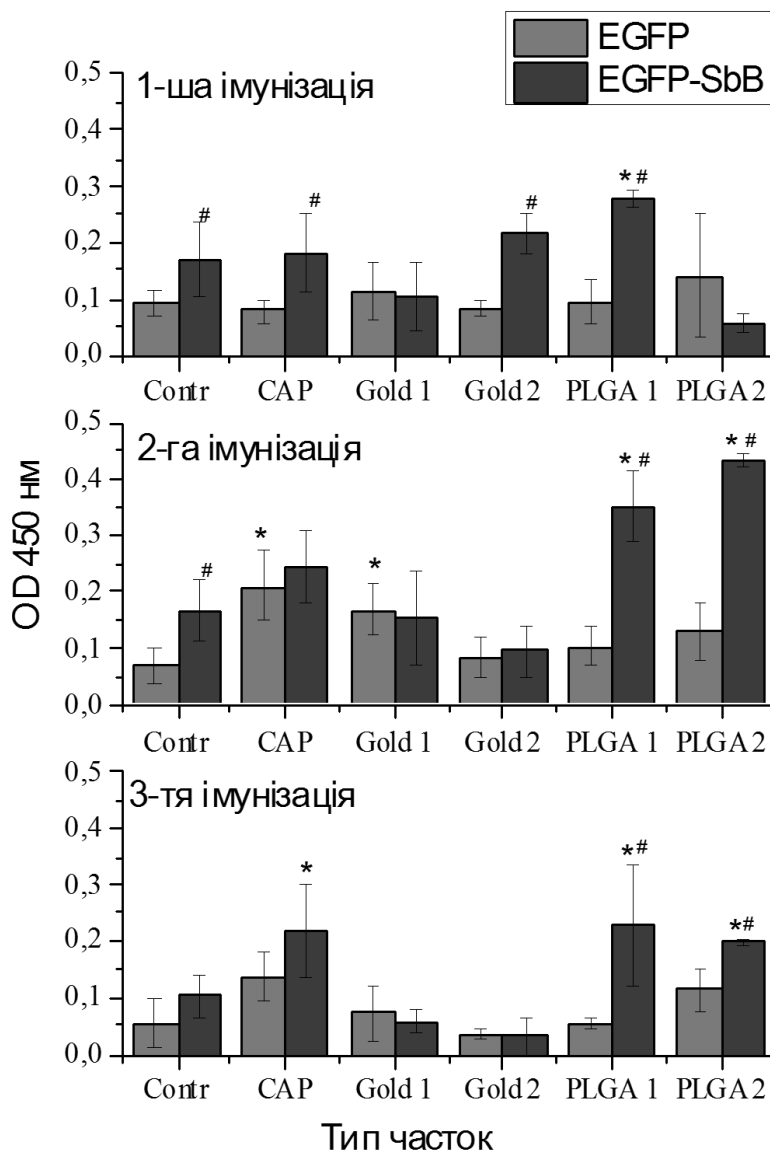


Рисунок 3.12. Гістограми, що відображають кількість антитіл класу А проти субодиниці В ДТ в сироватці крові мишей, імунізованих частками з іммобілізованим антигеном – EGFP-SubB або контрольним антигеном – EGFP. ($M \pm SE$, $n=4-6$).

* $P \leq 0.05$ у порівнянні з контрольною групою імунізованою антигеном EGFP-SubB,

$P \leq 0.05$ у порівнянні з контрольною групою, імунізованою наночастками з іммобілізованим антигеном – EGFP.

3.5.3 Підтвердження специфічності розпізнавання досліджуваного антигену антитілами сироватки крові імунованих тварин

Для підтвердження специфічності гуморальної імунної відповіді проти досліджуваного антигену у експериментальних тварин проводили додатковий варіант непрямого ІЕА з використанням контрольного антигену – сироваткового альбуміну бика (БСА) (рис. 3.13). Таким чином, розпізнавання сироваткою GST-SubB вказувало на рівень IgG, які здатні розпізнати SubB, а розпізнавання сироваткою БСА – вказувало на рівень неспецифічних, поліреактивних антитіл, тобто таких, які здатні розпізнавати широкий спектр антигенів.

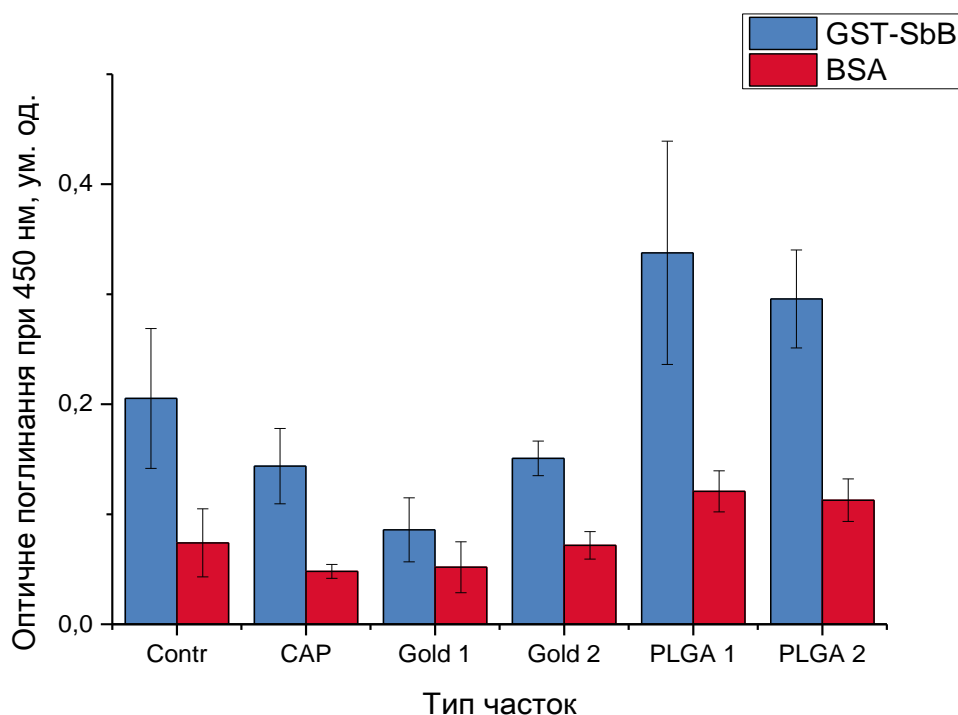


Рисунок 3.13. Рівень антитіл класу G, які розпізнають субодиницю B ДТ (SubB) та бичачий сироватковий альбумін (BSA) в сироватці крові мишей, імунованих частками з іммобілізованим антигеном – EGFP-SubB. Графіки представляють результати, отримані після 3-ї імунізації тварин. ($M \pm SE$, $n=4-6$).

Відмічено, що рівень антитіл, які розпізнають БСА, майже в усіх зразках складає від третини до половини від аналогічного досліду з розпізнаванням GST-SubB. В цілому, ці результати підтверджують, що попередні дані щодо рівня антитіл класу G для сироваток крові тварин, імунізованих наночастками, представляють переважно специфічне розпізнавання досліджуваного антигену.

Отже, отримані дані вказують на перспективність використання часток PLGA 1 та PLGA 2, як носіїв антигену для пероральної імунізації. Цей тип часток не чинив цитотоксичного впливу на клітини навіть у надвисоких концентраціях. За результатами проточної цитометрії та конфокальної мікроскопії було показано їх здатність до сорбції та проникнення у фагоцитарні клітини. Також, частки PLGA показали найкращі результати у якості ад'ювантів *in vivo* та чинили вплив на синтез специфічних антитіл класів A та G до іммобілізованого антигену.

3.6 Висновки до розділу

1. Одержано частки на основі золота, фосфату кальцію та полі(D,L-лактид-ко-гліколіду), які мали розміри 8-100 нм, та оптимізовано методики іммобілізації протеїнового антигену – рекомбінантного похідного субодиниці В дифтерійного токсоїду.

2. Встановлено, що клітинами лінії J774 найкраще фагоцитуються частки на основі полі(D,L-лактид-ко-гліколіду), менш ефективно – наночастки золота та фосфату кальцію.

3. Наночастки золота та фосфату кальцію у високих концентраціях проявляли цитотоксичний вплив по відношенню до клітин ліній L929 та U937 при дослідженні *in vitro* (для часток золота $IC_{50} \approx 1,5$ мг/мл та для часток

фосфату кальцію $IC_{50} \approx 7$ мг/мл), а для часток на основі полі(D,L-лактид-ко-гліколіду) цитотоксичного ефекту не було виявлено.

4. Показано, що частки на основі полі(D,L-лактид-ко-гліколіду), з іммобілізованим антигеном найкраще стимулюють продукцію специфічних сироваткових антитіл класів G.

5. Найвищі рівні специфічних сироваткових IgA визначали також у груп тварин, імунізованих кон'югатами часток на основі полі(D,L-лактид-ко-гліколіду).

Основні наукові результати розділу опубліковані в роботах:

1. Chudina T.O., Labyntsev A.Y., Kolybo D.V., Komisarenko S.V. Adjuvant properties of nanoparticles of different chemical structure immobilized with recombinant diphtheria toxoid. *Biotech. Acta.* 2017, 10(4): 14-24. *(Особистий внесок здобувача: виділення та очистка рекомбінантних протеїнів, синтез часток та іммобілізація антигену, характеристика комплексів, пробо підготовка матеріалу для дослідження взаємодії з культурами клітин, імунізація тварин та збір проб для аналізу, обробка та узагальнення результатів, оформлення рукопису)*

2. Чудіна Т.О. Ад'ювантні властивості наночасток різного розміру та хімічної будови з іммобілізованим рекомбінантним фрагментом дифтерійного токсину при імунізації per os. / Криніна О.І, Манойлов К.Ю., Короткевич Н.В., Лабинцев А.Ю. // Конференції-конкурсу молодих вчених "Актуальні проблеми біохімії та біотехнології-2014", 29-30 травня, 2014р.: матер. конфер. - м. Київ, 2014. - С. 222.

3. Chudina T.O. Current strategies for mucosal immunization / Kolybo D.V., Labyntsev A.J. // II International Scientific Conference, "Microbiology and Immunology – the development outlook in the 21st century", 14-15 April, 2016: матер. конфер. – Kyiv, 2016 - P.114;

4. Chudina T.O. Importance of dosage and immunization schedule on the adjuvancity of poly(lactide-co-glycolide) particles as antigen carriers for immunization per os. / Labyntsev A.J., Kolybo D.V., Komisarenko S.V. // RECOOP Abstracts for the Croatian Medical Journal, Bridges in Life Science 10th Annual Conference, 16-19 April, 2015: матер. конфер. - Wroslaw, Poland, 2015 P. 31.

РОЗДІЛ 4

ХАРАКТЕРИСТИКА ЧАСТОК НА ОСНОВІ ПОЛІ(D,L-ЛАКТИД-КО-ГЛІКОЛІДУ) З ІММОБІЛІЗОВАНИМ ФРАГМЕНТОМ ДИФТЕРІЙНОГО ТОКСОЇДУ

За результатами попередніх досліджень було показано, що частки на основі полі(D,L-лактид-ко-гліколіду) не чинять цитотоксичного впливу, найбільш виражено фагоцитуються макрофагоподібними клітинами та найбільш ефективно стимулюють імунну відповідь на іммобілізований на них антиген. Усі ці факти підтверджують ефективність використання цих часток у якості ад'юванту для створення пероральних вакцин. Саме тому подальші дослідження щодо детальних характеристик кон'югатів, підбору дозувань та схем імунізацій проводили лише для часток PLGA.

У зв'язку з тим, що частки синтезовані на основі PLGA здатні контролювано вивільняти біологічні молекули, які в них містяться, ми вирішили модифікувати методику синтезу часток PLGA 2, засновану на принципі подвійної емульсифікації з використанням методу випаровування розчинника таким чином, що антиген інкапсулюється всередині часток.

При проведенні кон'югації з цільовим антигеном були внесені зміни співвідношень протеїна та часток, завдяки чому вдалося збільшити ефективність посадки антигену на часточки у порівнянні з попереднім етапом. Такі оптимізації дозволяють збільшити навантаження часток, що, в свою чергу, може вплинути на збільшення ефективності формування імунної відповіді на цільовий антиген.

У зв'язку зі внесеними змінами до процесу синтезу часток та їх навантаження антигеном, надалі вони представляються як PLGA 1* та PLGA 2*.

4.1 Характеристика часток на основі полі(D,L-лактид-ко-гліколіду) з іммобілізованим фрагментом дифтерійного токсоїду

4.1.1 Визначення ефективності навантаження модифікованих часток на основі полі(D,L-лактид-ко-гліколіду) рекомбінантним похідним субодиниці В дифтерійного токсоїду

Необхідною умовою успішного проведення імунізації та розвитку ефективної імунної відповіді є достатня кількість введеного антигену. З огляду на це, важливим показником є ефективність сорбції антигену на частки.

Нами було проведено синтез часток на основі PLGA та їхню кон'югацію з протеїном за двома різними методиками, що дозволило отримати два різновиди PLGA часток: з іммобілізованим антигеном на поверхні часток (PLGA 1*) та з інкапсульованим антигеном всередині часток (PLGA 2*).

Ефективність іммобілізації протеїнового антигену в полімерних частках оцінювали за допомогою методу електрофоретичного розділення шляхом порівняння концентрації доданого протеїну і концентрації у зразках, що містили протеїн, який залишився незв'язаним після навантаження (надосадова рідина після центрифугування). Результати електрофорезу вищезазначених зразків та протеїну окремо представлені на рисунку 4.1.

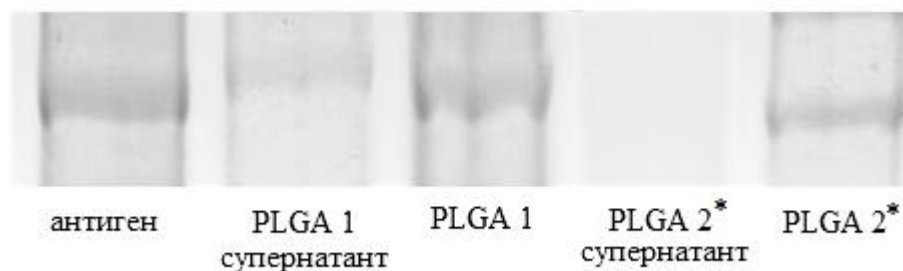


Рисунок 4.1. Електрофореграма визначення ефективності сорбції протеїну EGFP-SubB на частки PLGA 1* та PLGA 2*, де: PLGA 1* та PLGA * – протеїн, що іммобілізувався на частинках, PLGA 1* супернатант та PLGA 2* супернатант – не іммобілізований протеїн

На основі отриманих даних розраховано ефективність іммобілізації протеїну (ЕІ) та навантаження часток (НЧ) за раніше наведеними формулами. Таким чином, ефективність іммобілізації антигеном була вища для часток, синтезованих за другою методикою і становила близько 90%, в той час як іммобілізація протеїну на частки PLGA 1 була ефективна на 72% (табл. 4.1).

Таблиця 4.1

Характеристика часток PLGA, включаючи ефективність іммобілізації антигену та навантаження часток, їхні розміри за двома різними методами (NTA та ЛКС) та PDI індекс.

Досліджувані параметри		PLGA 1*	PLGA 2*
Ефективність іммобілізації, ЕІ (%)		72	90
Навантаження часток, НЧ (%)		6,6	8,2
Розмір часток за NTA (nm)	Mode	81,4	155,9
	Mean	183,8	192,8
Розмір часток за ЛКС (nm)	Mean	203,3	211,6
PDI		0,2	0,1

Схожа закономірність спостерігається і при визначенні навантаження часток, так, НЧ для PLGA 1* було нижче і становило 6,6%, у той час як для PLGA 2* - 8,2% (табл. 4.1).

Цікавим також було дослідити не лише ефективність іммобілізації протеїну відносно загального пулу часток, а і те чи усі частки окремо містять у своєму складі цільовий антиген. Визначити це вдалося завдяки наявності флюорисцентної мітки EGFP у складі рекомбінантного похідного ДТ використовуючи метод протокової цитофлуориметрії. При цьому було продемонстровано, що 99% часток PLGA 1 кон'юговані з EGFP-SubB, у той час як лише 92,2% PLGA 2* часток зв'язані з протеїном. Відповідно до

отриманих результатів можна сказати, що навантаження відбувається ефективніше при інкапсуляції антигенів всередині частки, проте кількість часток що містять протеїн у своєму складі при цій методиці синтезу дещо менша.

4.1.2 Характеристика розмірів PLGA часток, синтезованих за різними методиками

На наступному етапі було проведено визначення розмірів часток двома різними методами: за допомогою NTA (від англ. Nanoparticle Tracking Analysis) – аналізу траєкторії часток і ЛКС (від англ. Dynamic light scattering) – лазерної кореляційної спектроскопії.

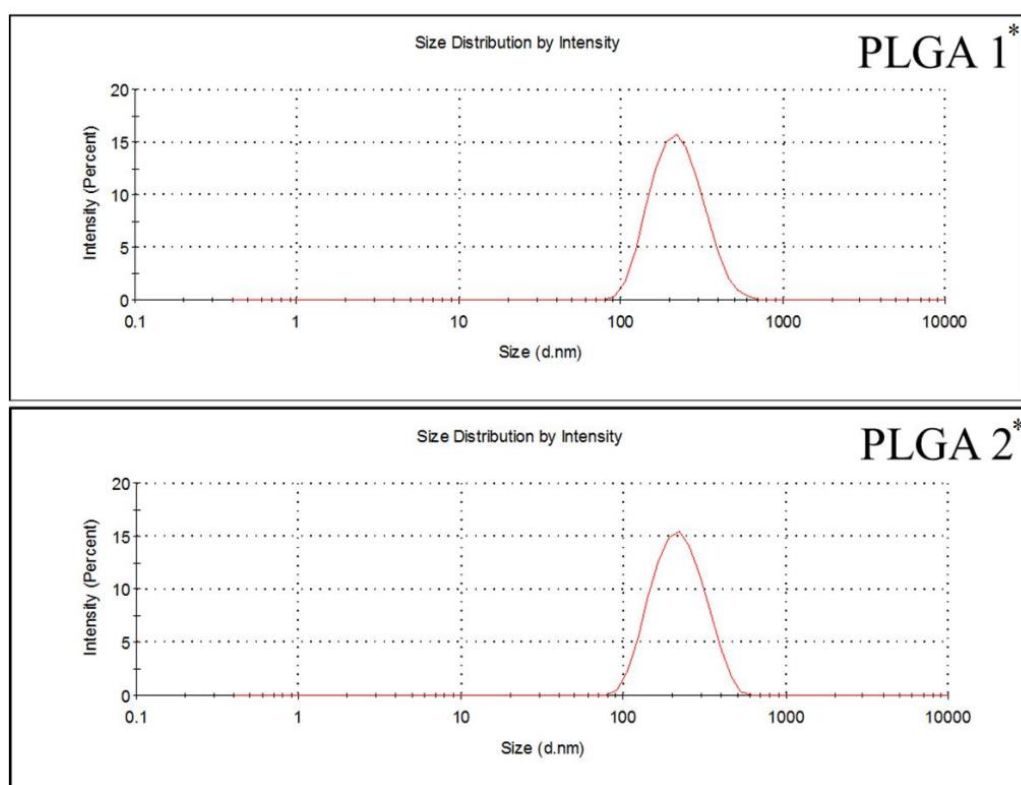


Рисунок 4.2. Типовий розподіл розміру часток, синтезованих на основі полі(D,L-лактид-ко-гліколіду), згідно даних ЛКС (лазерної кореляційної спектроскопії).

Одержані результати незначно відрізнялися, однак демонстрували певну закономірність (табл. 4.1). Результати ЛКС показують, що середній розмір PLGA 1* складав 203,3 нм, а PLGA 2* – 211,6 нм. Проте, зважаючи на результати розподілу часток за розміром, можна відмітити розподіл пулу часток які відрізняються за розмірами у межах від 90 нм до 700 нм (рис. 4.2).

Результати NTA також демонструють, що середній розмір часток PLGA 1* дещо менший у порівнянні з частками PLGA 2* – 183.8 нм та 192.8 нм відповідно (рис. 4.3).

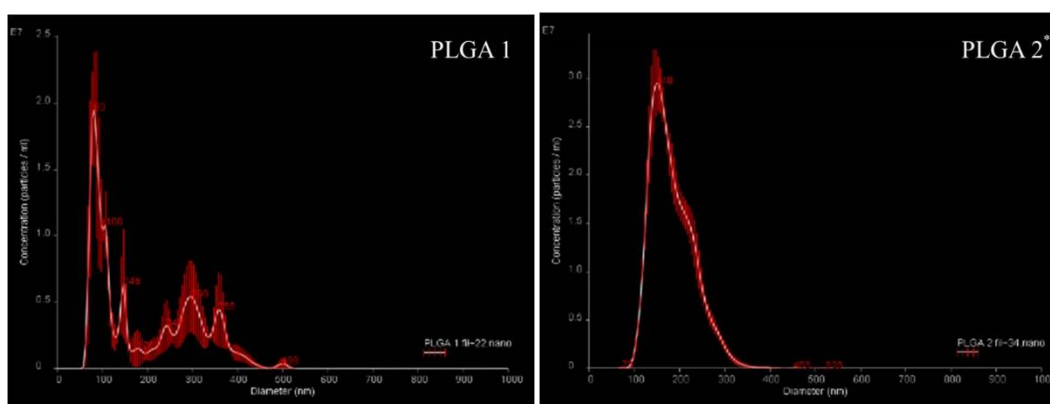


Рисунок 4.3. Розподіл часток, синтезованих на основі полі(D,L-лактид-ко-гліколіду), за розміром згідно даних NTA – аналізу траєкторії часток

Якщо ж розглядати показник, що демонструє розмір часток які переважають у суспензії (Mode), то варто відмітити що показники значно зменшуються. Відтак більшість часток PLGA 1* мають розміри 81,4 нм, а PLGA 2* - 155,9 нм (табл. 4.1). Можна припустити, що такий розподіл є результатом утворення конгломератів. Саме таке припущення пояснює наявність піків, що відображають розподіл часток у суспензії PLGA 1* (рис. 4.3).

4.1.3 Характеристика морфології PLGA часток, синтезованих за різними методиками

Результати електронної мікроскопії часток PLGA підтвердили результати, наведені вище. Як видно зі знімків (рис. 4.4), поодинокі частки мають округлу правильну форму, їх розміри знаходяться в межах розмірів, визначених за даними NTA та ЛКС. Однак на мікрофотографіях помітні, як поодинокі частинки, так і більші за розміром утворення, які, швидше за все, є конгломератами окремих частинок, що екранують одна одну.

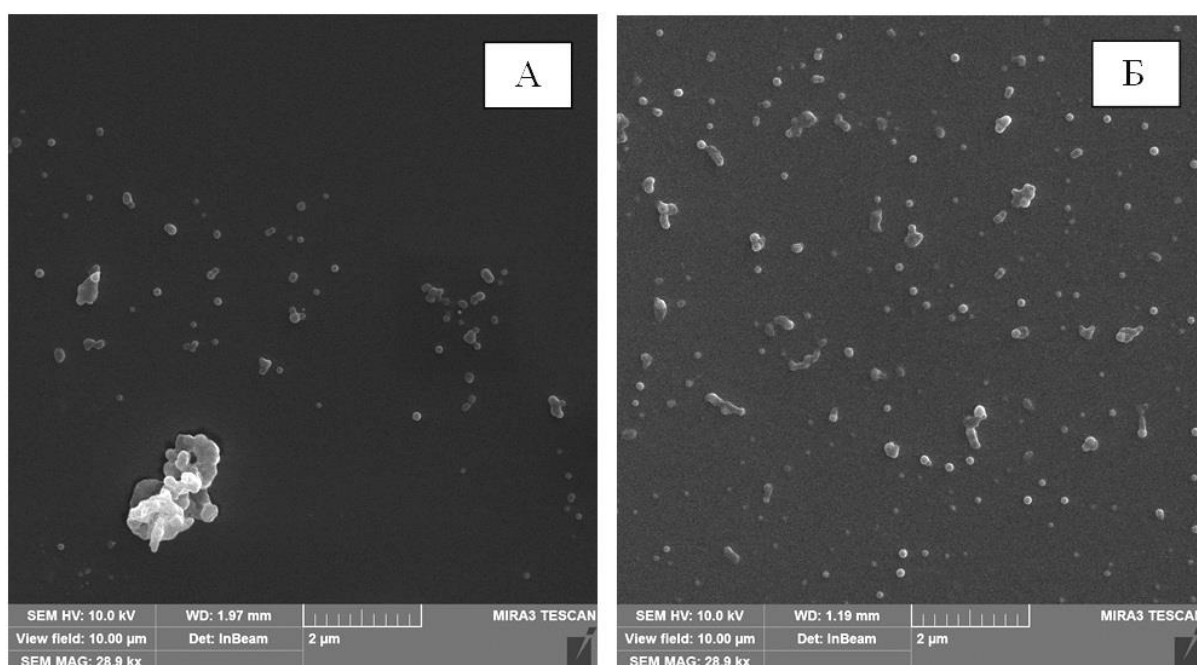


Рисунок 4.4. Електронні мікрофотографії часток, синтезованих на основі полі(D,L-лактид-ко-гліколіду): А – PLGA 1*; Б – PLGA 2*

Варто відзначити що PLGA 2* частки мали більш гомогенний розподіл часток у розмірі, де містились як поодинокі частки, так і невеликі конгломерати двох-трьох часток. В той час як суспензія часток PLGA 1* містила великі скупчення часток .

4.1.4 Порівняння PLGA часток після модифікації схем синтезу

Оптимізація сорбції антигену на частки полягала у зміні співвідношень антигену та PLGA, а також реакційного об'єму. Вдалося отримати набагато вищі показники ефективності сорбції антигену на 1 мг наночасток. Для більшої наочності представлення даних, порівняння результатів ефективності сорбції антигену на частки та їхнього розміру подано на рис. 4.5.

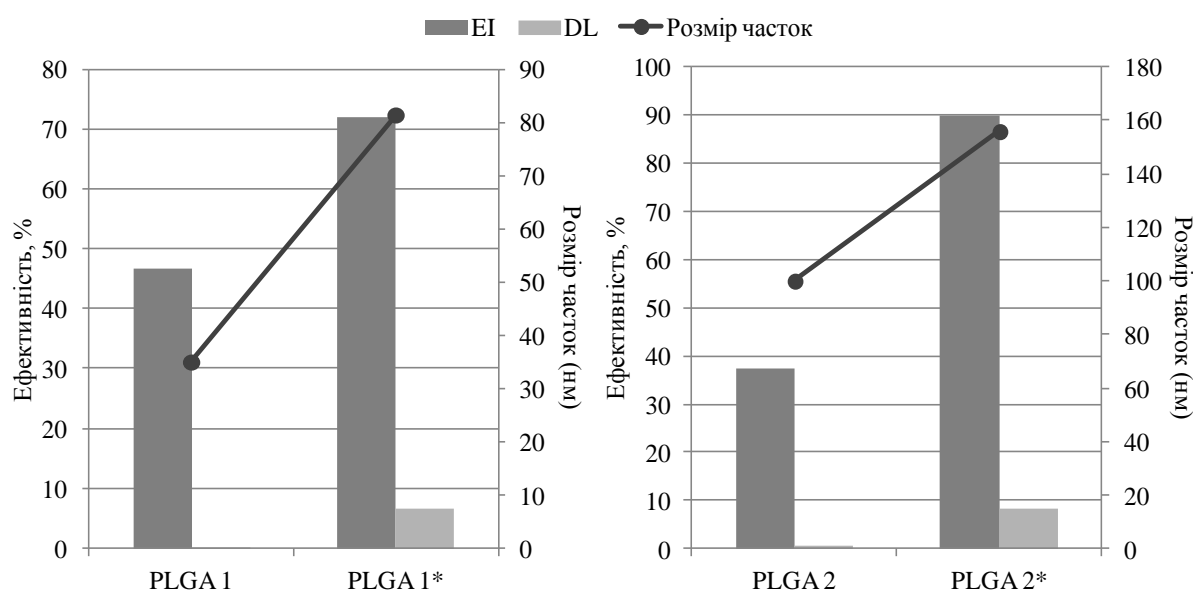


Рисунок 4.5. Вплив модифікацій синтезу часток на основі полі(D,L-лактид-ко-гліколіду) на показники: ефективності іммобілізації, (EI, %), навантаження часток (НЧ, %) та розмір часток (нм).

Виходячи з отриманих даних, можливо стверджувати, що нам вдалося збільшити ефективність іммобілізації антигену у 1,5 разів та у 2,5 рази порівняно з попередніми результатами для PLGA 1* та PLGA 2* часток відповідно. Гарні результати були отримані і для показника навантаження часток, що зросли і для PLGA 1* і для PLGA 2* часток (у 44 та 16 разів відповідно). Змінились, також, і розміри часток. Проте їхнє порівняння є

досить умовним, адже методики визначення розмірів використовувались різні.

4.1.5 Характеристика швидкості вивільнення антигену з PLGA часток, синтезованих за різними методиками, та визначення впливу рН середовища на процеси вивільнення антигену

На наступному етапі були проведені дослідження швидкості вивільнення антигену з PLGA часток та впливу рН середовища на процеси вивільнення антигену. Для визначення впливу рН середовища на швидкість вивільнення антигену синтезовані частки PLGA, навантажені рекомбінантним антигеном EGFP-SubB, інкубувались в середовищі, яке імітує кислотність шлункового соку (розчин соляної кислоти з рН 1,2) та, як контроль, в ФБР (рН 7,8). Дослідження проводилось за стабільної температури, близької до температури людського тіла - 37°C. Зразки відбирались через різні проміжки часу: через 15 хв, 30 хв, 60 хв, 120 хв та 240 хв. Оскільки частки були навантажені флуоресцентним рекомбінантним антигеном, визначення їхнього ступеню деградації проводили за допомогою протокової цитофлуориметрії. Дані, що відображають залежність процесу деградації часток від часу інкубації у різних середовищах, наведено в таблиці 4.2.

Продемонстровано, що на початку експерименту 99% часток PLGA 2* кон'юговані з протеїном EGFP-SubB. Не помічено значних змін і у групах, де інкубацію проводили у буферному середовищі з рН 7,8. Вражаючими були наслідки після інкубації часток PLGA 2* в середовищі з високою кислотністю: вже через 15 хв інкубації кількість часток, що містили в собі антиген, знизилась практично у 9 разів і становила 8,5%; через 0,5 години інкубації цей показник зменшився до 5,7%; година впливу низького рН залишила навантаженими лише 3,7% часток; двогодинна інкубація знизилася їхню кількість до 2,1%; а через 4 години навантажених часток лишилось

всього 1,88%. Схожою, проте ще більш критичною ситуація була і у випадку часток PLGA 1*. Кількість навантажених часток становила 5,8%, 3,3%, 2,7%, 2,5% та 1,7% відповідно через 0,25 год, 0,5 год, 1 год, 2 год та 4 год інкубації в середовищі з високою кислотністю.

Таблиця 4.2

Визначення впливу рН середовища на швидкість вивільнення антигену з часток PLGA

№	Час інкубації	Кількість часток, навантажених протеїном, %		
		Імітація кислотності шлункового соку, рН 1,2		Контрольне буферне середовище, рН 7,8
		PLGA 1*	PLGA 2*	
1	Контрольна група	92,2	99,0	92,20
2	15 хв	5,8	8,5	без суттєвих змін
3	30 хв	3,3	5,7	без суттєвих змін
4	60 хв	2,7	3,7	без суттєвих змін
5	120 хв	2,5	2,1	без суттєвих змін
6	240 хв	1,7	1,9	без суттєвих змін

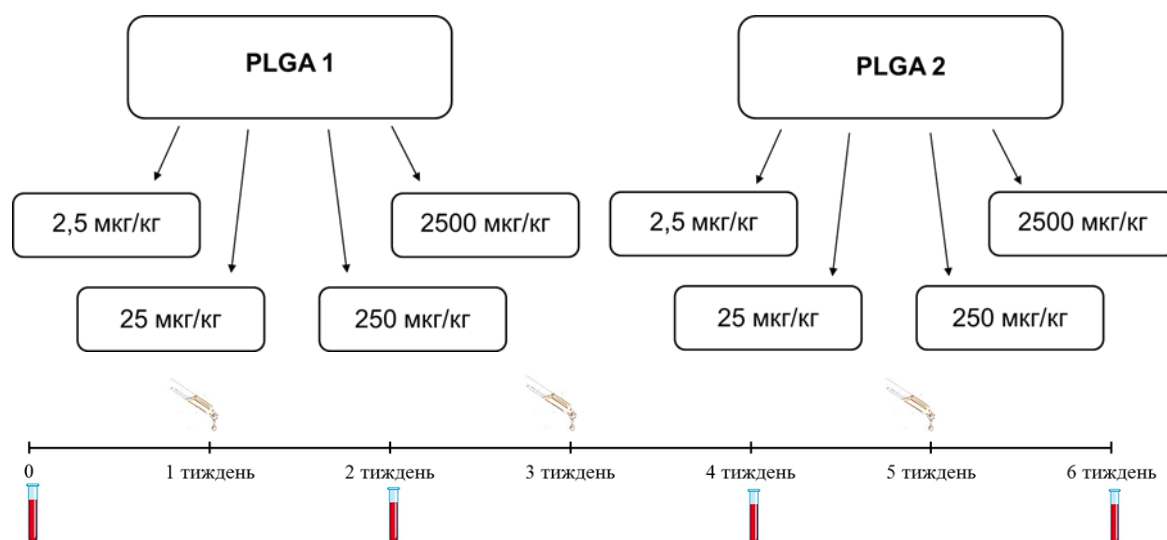
Отримані дані свідчать про досить інтенсивну деградацію часток та негативний вплив рН середовища на швидкість вивільнення антигену з часток PLGA. Вирішити цю проблему могло б допомогти покриття полімерних часток захисним шаром, наприклад хітозану чи целобіози.

4.2 Оцінка ефективності прояву імуногенних властивостей кон'югованого з частками PLGA антигену в залежності від дози введення

Для визначення оптимальних доз кон'югатів часток з антигеном, які б стимулювали імунну відповідь проти введеного антигену при пероральній

імунізації нами було проімунізовано експериментальних тварин та досліджено стан гуморальної ланки імунітету. В якості модельного організму для імунізації використовували мишей *Mus musculus* лінії BALB/c, однакового віку, що становив 2 місяці, та масою близько 20 грам. Тварин було поділено на 2 групи в залежності від типу часток на які було іммобілізовано цільовий антиген: PLGA 1* та PLGA 2* (рис. 4.6).

Групи, в свою чергу, було поділено на 4 підгрупи які отримували різні дози антигену сорбованого на частках, а саме 2,5 мкг/кг, 25 мкг/кг, 250 мкг/кг та 2500 мкг на 1 кг маси тіла тварини. Кожна підгрупа складалась з 9 експериментальних тварин.



Ри сунок 4.6. Схема експерименту

Мишей імунізували *per os* розчином часток з іммобілізованим протеїном EGFP-SubB у відповідних дозуваннях. Для визначення контрольного рівня стану імунітету експериментальних тварин проводився збір проб до проведення імунізацій. Схема експерименту складалась з трьох етапів введення часток з іммобілізованим антигеном мишам перорально з періодичністю в 2 тижні. Через тиждень після кожної імунізації здійснювали забір проб для проведення подальших досліджень. Проби відбиралися з хвостової вени (сироватка крові) та зберігалися при -20°C .

4.2.1 Визначення титрів антитіл класу G у сироватці крові тварин, імунізованих різними дозами антигену, іммобілізованого на частках PLGA.

Визначення стану гуморального імунітету у експериментальних тварин після імунізацій проводили шляхом визначення рівня сироваткових специфічних проти антигену антитіл класів G та A. Для аналізу вмісту в пробах антитіл проти антигену, іммобілізованого на частках, застосовували непрямий ІЕА. В якості антигену використовували протеїн EGFP-SubB, до якого проводили імунізацію. Для визначення вмісту IgG як вторинні антитіла використовували конюгати антитіл до Fc-фрагментів IgG.

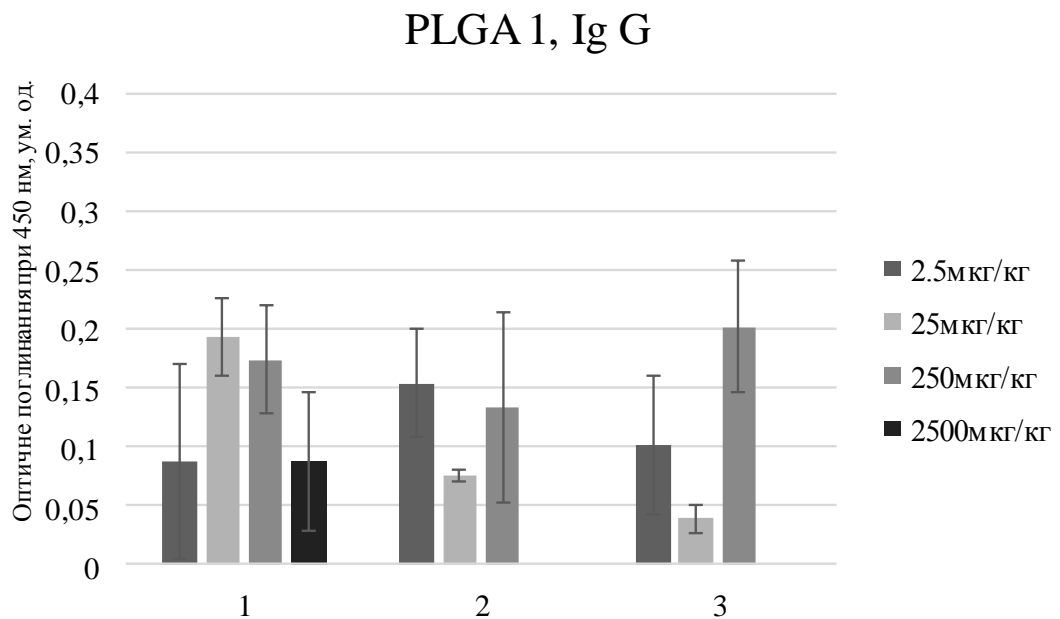


Рисунок 4.7. Гістограма, що відображає середні рівні сигналу в ІЕА для специфічних антитіл класу G проти субодиниці B ДТ в сироватці крові мишей після 1-ї, 2-ї або 3-ї імунізації частками PLGA 1* з іммобілізованим антигеном EGFP-SubB з різним дозуванням після віднімання рівня сигналу в ІЕА для сироваток інтактних мишей. Статистичні дані подані, як $M \pm SE$, $n=7-9$.

На рисунку 4.7 подано результати розрахунків абсолютного вмісту антитіл IgG до модельного антигену в сироватці крові мишей, імунізованих частками PLGA 1* у різних концентраціях. Відбір проб для аналізу відбувався через тиждень після кожної імунізації.

Після першої імунізації частками рівень IgG до SubB в сироватці крові був підвищений майже для всіх проб отриманих з тварин імунізованих частками. Проте, найвищі рівні специфічних антитіл до SubB (антитіл, що розпізнавали EGFP-SubB після імунізації антигеном), був наявний лише для тварин, імунізованих частками PLGA 1* з дозуваннями антигену 25 мкг/кг та 250 мкг на 1 кг маси тіла. Для груп, що отримували антиген у дозах 2,5 мкг/кг та 2500 мкг/кг, результати були дещо нижчі.

В результаті другої імунізації абсолютна кількість IgG до антигену в пробах тварин, імунізованих частками з іммобілізованим протеїном у дозі 2,5 мкг/кг, підвищився у порівнянні з результатами після першої імунізації. Для проб у групи, що отримувала антиген, сорбований на частки PLGA 1* у дозуванні 250 мкг/кг, також можливо було відмітити високий рівень специфічних до SubB антитіл класу G, проте він майже співпадав з результатами, одержаними після першої імунізації. Важливо відмітити, що після другої імунізації рівень специфічних антитіл IgG знизився у групи, яку імунізували з дозуванням антигену 25 мкг/кг. Для тварин, що отримували найвищу дозу антигену, яка становила 2500 мкг протеїна на 1 кг маси тіла, рівні антитіл не відрізнялися від контролю. Ймовірно, повторна імунізація такими концентраціями приводила до толяризації імунної системи організму по відношенню до введеного антигену.

В пробах, отриманих після третьої імунізації, високий рівень специфічних IgG зберігався лише у тварин, імунізованих частками PLGA 1 з іммобілізованим протеїном EGFP-SubB у дозі 250 мкг/кг. В інших групах відмічали зниження специфічних сироваткових антитіл класу G порівняно з другою імунізацією, а для групи, що отримувала антиген у дозі 2500 мкг/кг, концентрація IgG залишалась на рівні контролю.

Отримані дані вказують, що для стимуляції продукції специфічних проти цільового антигену антитіл класу G з використанням часток полі(D,L-лактид-ко-гліколіду) першого типу оптимальна доза для імунізації *per os* становить 250 мкг/кг. При цьому достатньо проводити одну імунізацію, оскільки повторення процедури не призводить до збільшення вмісту специфічних IgG.

Аналогічні обрахунки проводили і для груп тварин, імунізованих частками PLGA 2* з іммобілізованим антигеном з різними дозуваннями.

Після першої імунізації частками PLGA 2* можна відмітити високі рівні специфічних IgG для усіх груп (рис. 4.8), при чому абсолютний вміст антитіл був значно вищий у порівнянні з результатами після першої імунізації частками PLGA 1* (рис. 4.7). Найкращі результати можна відмітити для груп, імунізованих PLGA 2* з сорбованим антигеном SubB у дозах 25 мкг/кг та 250 мкг/кг. У груп тварин, які отримували кон'югати часток з антигеном у дозах 2,5 мкг/кг та 2500 мкг/кг, рівні специфічних антитіл класу G були дещо нижчі, проте ці значення були кращі у порівнянні з групами, імунізованими частками PLGA 1*.

Після другої імунізації частками полі(D,L-лактид-ко-гліколіду) рівні досліджуваних антитіл не мали суттєвої тенденції до збільшення. Абсолютні рівні антитіл класу G не значно відрізнялись від таких після першої імунізації та перевищували результати у порівнянні з групами, імунізованими частками PLGA 1*. Найвищі результати відмічались для груп, що отримували частки другого типу з сорбованим антигеном у дозуваннях 25 мкг/кг та 2500 мкг/кг.

В результаті третьої імунізації рівні специфічних IgG знизились для всіх груп, що отримували антиген іммобілізований на частках PLGA 2*. Найкращі значення були одержані для груп, що отримували антиген, сорбований на частках, у дозуваннях 25 мкг/кг та 2500 мкг/кг. Проте значення цього показника для інших груп експериментальних тварин, що були імунізовані кон'югатами часток з протеїном SubB в інших дозуваннях, не сильно відрізнялись від лідерів та перевищували контроль.

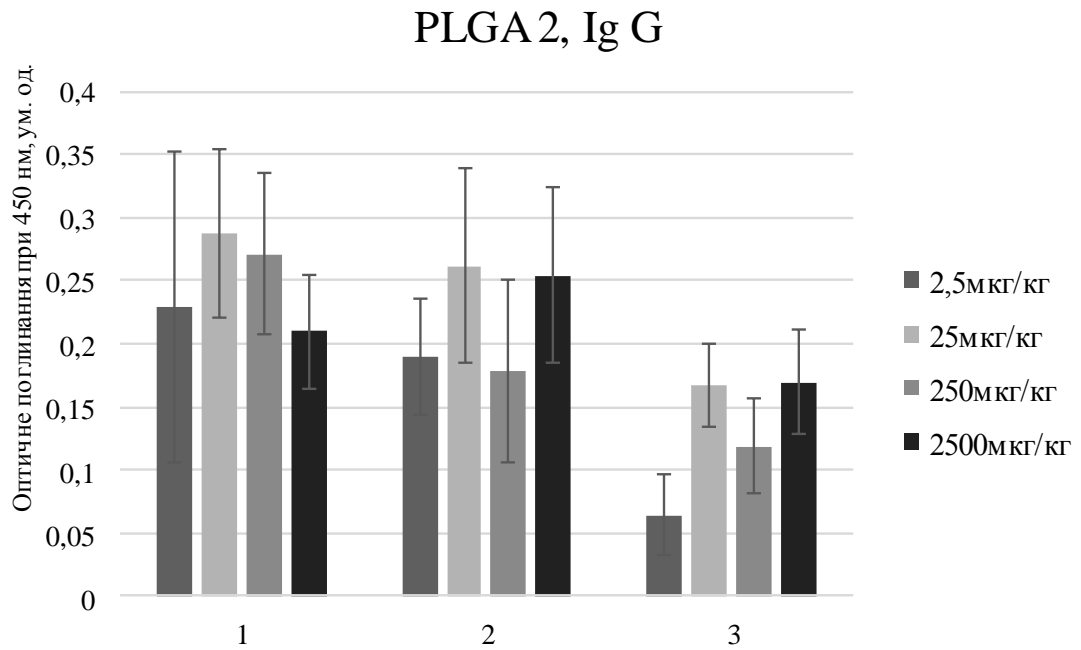


Рис. 4.8. Гістограма, що відображає середні рівні сигналу в ІЕА для специфічних антитіл класу G проти субодиниці B ДТ в сироватці крові мишей після 1-ї, 2-ї або 3-ї імунізації частками PLGA 2* з іммобілізованим антигеном EGFP-SubB з різним дозуванням після віднімання рівня сигналу в ІЕА для сироваток інтактних мишей. Статистичні дані подані, як $M \pm SE$, $n=7-9$.

Отже, отримані дані вказують на перспективність використання наночасток PLGA 2* для стимуляції продукції специфічних IgG у імунізованих тварин.

4.2.2 Визначення титрів антитіл класу A у сироватці крові тварин імунізованих різними дозами антигену, іммобілізованого на частках PLGA.

Отримані у даному досліді проби сироватки крові тварин, імунізованих частками з іммобілізованим антигеном, також аналізували на вміст специфічних до SubB антитіл класу A. Схема непрямого ІЕА була

аналогічною до наведеної вище, проте, в якості вторинних антитіл використовували антитіла проти Fc-фрагментів IgA.

Результати аналізу вмісту IgA в сироватці крові тварин, імунізованих частками PLGA 1*, подані на рисунку 4.9. Після першої імунізації рівень IgA, специфічних до SubB, був визначений для всіх груп. Найкращі результати відзначались у груп що отримували частки з іммобілізованим антигеном у дозуваннях 2,5 мкг/кг, 250 мкг/кг та 2500 мкг/кг.

В результаті другої імунізації відбулося підвищення рівня специфічних IgA в пробах груп тварин що отримували частки з сорбованим антигеном у дозі 2,5мкг/кг. А от значення для груп що отримували дозування антигену 250 мкг/кг та 2500 мкг/кг були дещо знижені у порівнянні з результатами після першої імунізації.

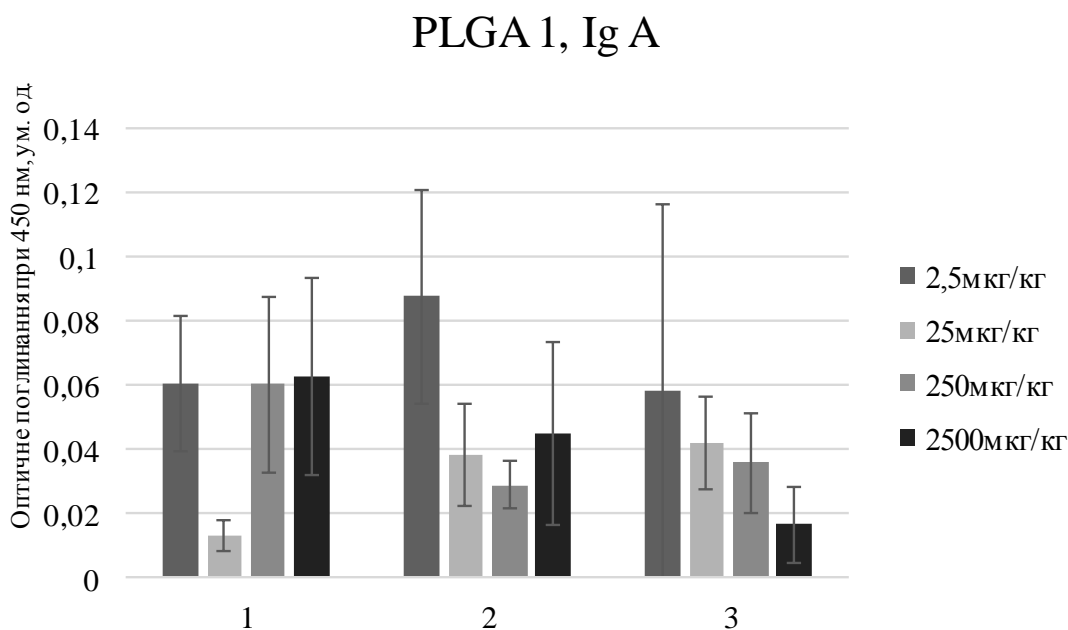


Рисунок 4.9. Гістограма, що відображає середні рівні сигналу в ІЕА для специфічних антитіл класу А проти субодиниці В ДТ в сироватці крові мишей після 1-ї, 2-ї або 3-ї імунізації частками PLGA 1* з іммобілізованим антигеном EGFP-SubB з різним дозуванням після віднімання рівня сигналу в ІЕА для сироваток інтактних мишей. Статистичні дані подані, як $M \pm SE$, $n=7-9$.

Після третьої імунізації тварин частками PLGA 1* рівні специфічних антитіл класу А майже не відрізнялись від значень після другої імунізації для груп імунізованих у дозах 25 мкг/кг та 250 мкг/кг. Найкращі значення відмічались для групи імунізованої частками з іммобілізованим антигеном у дозі 2,5 мкг/кг, проте це значення знизилась порівняно з другою імунізацією. Рівні специфічних IgA були знижені у порівнянні з другою імунізацією і у групи, що отримувала дозування антигену 2500 мкг/кг.

Отже, вміст IgA у сироватці крові тварин, імунізованих частками PLGA 1*, підвищувався, і найкращі результати можна відмітити для групи що отримувала частки в дозі 2,5 мкг антигену на 1 кг маси тіла тварини. Визначались специфічні антитіла і у тварин що отримували максимальну дозу, проте відмічалась тенденція до зниження після кожної імунізації, що, можливо, говорить про толяризацію до антигену при такій дозі. Схожу ситуацію помічено і при визначенні специфічних антитіл класу G у цієї групи.

При визначенні вмісту специфічних антитіл класу А у тварин що отримували частки PLGA 2* після першої імунізації можна визначити одностайного лідара (рис. 4.10). Група тварин що отримувала кон'югати з дозуванням антигену 2,5 мкг/кг показала найвищі результати рівня сироваткових специфічних до цільового антигену IgA. У інших групах, що отримували антиген сорбований на PLGA 2* теж визначались специфічні антитіла класу А, проте вони були на багато нижчі.

Після другої імунізації відмічено значне зниження вмісту IgA у групи що отримувала дозування антигену 25 мкг/кг. А от у тварин, групи яких отримували частки з сорбованим протеїном у дозуваннях 250 мкг/кг та 2500 мкг/кг можна помітити незначні збільшення вмісту специфічних антитіл класу А.

PLGA 2, Ig A

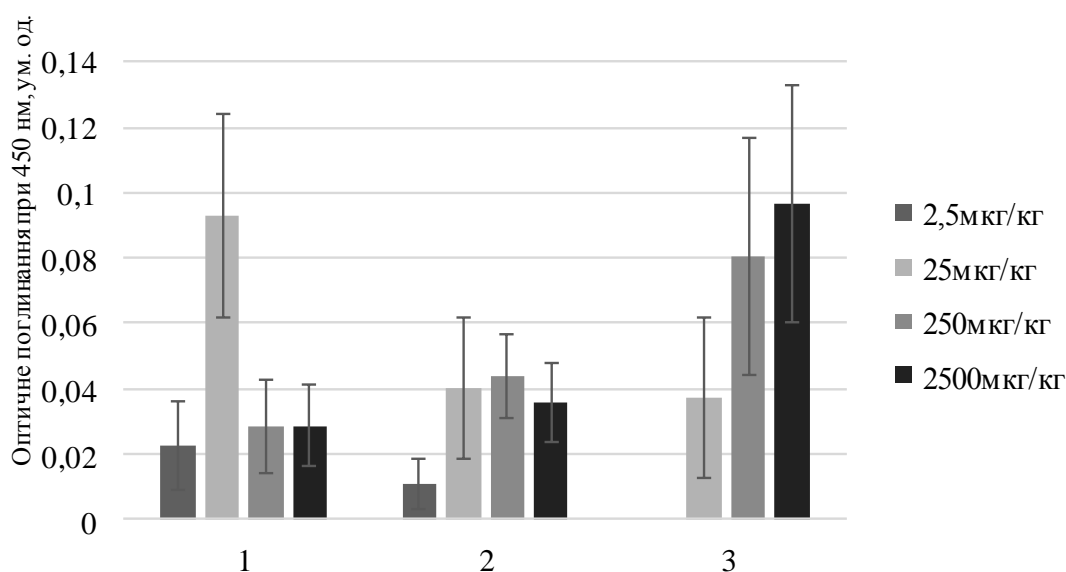


Рисунок 4.10. Гістограма, що відображає середні рівні сигналу в ІЕА для специфічних антитіл класу А проти субодиниці В ДТ в сироватці крові мишей після 1-ї, 2-ї або 3-ї імунізації частками PLGA 2* з іммобілізованим антигеном EGFP-SubB з різним дозуванням після віднімання рівня сигналу в ІЕА для сироваток інтактних мишей. Статистичні дані подані, як $M \pm SE$, $n=7-9$.

В результаті третьої імунізації відбулося значне збільшення абсолютного вмісту антитіл класу А проти цільового антигену у групах що отримували частки PLGA 2* з сорбованим антигеном у дозуваннях 250 мкг/кг та 2500 мкг/кг. А от у групи що отримувала дозування 2,5 мкг антигену на 1 кг маси тіла рівень специфічних IgA знизився і не перевищував контрольних рівнів.

Отримані результати вказують, що частки PLGA 2* з сорбованим антигеном здатні підсилювати продукцію специфічних антитіл класу А при однократному пероральному введенні в дозуванні 25 мкг протеїну на 1 кг маси тіла або після третьої імунізації при введенні дозування антигену 2500 мкг/кг. Проте, потрібно краще дослідити вплив PLGA 2 при збільшених

дозах антигену або модифікації схеми його введення, адже можливе збільшення вмісту специфічних IgA при подальших імунізаціях.

Отже, за результатами визначення змін гуморальної ланки імунітету у тварин, яким була проведена пероральна імунізація наночастками на основі полі(D,L-лактид-ко-гліколіду) з іммобілізованим протеїном, можна стверджувати, що дозування та періодичність введення антигену впливають на продукцію специфічних антитіл. Показано, що утворення антитіл класу G, специфічних до сорбованого антигену, найкраще стимулюють частки PLGA 2* у дозуваннях 25 мкг/кг та 2500 мкг/кг; при цьому достатньо проводити двократну імунізацію. На синтез IgA істотний вплив мали частки PLGA 1* з концентрацією сорбованого антигену 2,5 мкг/кг, що максимально стимулювали синтез антитіл після другого введення з періодичністю в 2 тижні; та PLGA 2* з концентрацією антигену 25 мкг/кг, що мали вплив вже після першого їх введення та з концентраціями антигену 250 мкг/кг та 250 мкг/кг, що з кожним введенням збільшували рівні синтезу специфічних антитіл.

Підводячи підсумки, можна сказати, що найбільш ефективний вплив на синтез специфічних проти протеїна SubB антитіл класів G та A мали частки на основі PLGA 2* з іммобілізованим антигеном, що у дозуванні антигену в 250 мкг/кг здатні значно збільшувати їх вміст вже після першої імунізації. Саме тому подальші дослідження були зосереджені саме на цих частках

4.3 Висновки до розділу

1. Частки на основі полі(D,L-лактид-ко-гліколіду), кон'юговані з рекомбінантним похідним SubB за методикою 2, характеризувались найбільшою ефективністю навантаження антигеном (90 %).

2. Виявлено морфологічні особливості PLGA часток, синтезованих за різними методиками: частки PLGA 1* дещо менші за розміром ($mode=81.4\text{нм}$), проте частки PLGA 2* є більш гомогенними ($mode=155.9\text{нм}$).

3. Продемонстровано негативний вплив рН середовища, що імітує середовище шлунково-кишкового тракту, на процеси вивільнення антигену з PLGA часток, синтезованих за різними методиками. Показано, що цей вплив був більш критичний для часток PLGA 1*.

4. Показано, що кон'югати антигену з частками на основі PLGA 2* здатні до кращої стимуляції продукції специфічних сироваткових IgG, при цьому найвищі рівні антитілоутворення визначали при застосуванні антигену в дозі 250 мкг на 1 кг маси тіла

Основні наукові результати розділу опубліковані в роботах:

1. Chudina T.O., Labyntsev A.Y., Manoilov K.Y., Kolybo D.V., Komisarenko S.V. Cellobiose-coated poly(lactide-co-glycolide) particles loaded with diphtheria toxoid for per os immunization. *Croat Med J.* 2015, 56(2): 85-93. *(Особистий внесок здобувача: виділення та очистка рекомбінантних протеїнів, синтез часток та іммобілізація антигену, імунізація тварин та збір проб для аналізу, обробка та узагальнення результатів, оформлення рукопису)*

2. Chudina T.O., Skoryk M.A. Synthesis and characterization of diphtheria toxoid loaded Poly(D,L-lactic-co-glycolic)acid microparticles. *Biotech. Acta.* 2018, 11(2): 35-41. *(Особистий внесок здобувача: виділення та очистка рекомбінантних протеїнів, синтез часток та іммобілізація антигену, дослідження навантаження часток та швидкість вивільнення антигену, а також розмір часток, обробка та узагальнення результатів, оформлення рукопису)*

3. Chudina T.O. Characteristics of PLGA particles for per os immunization / Manoilov K.Y, Labyntsev A.J. // XI Міжнародна наукова конференція студентів і аспірантів "Молодь і поступ біології", 20-23 квітня, 2015: матер. конфер. - м. Львів, 2015 С. 556

4. Chudina T.O. Physic-chemical properties of two types of antigen-loaded PLGA carriers for oral immunization // II International Scientific Conference, "Microbiology and Immunology - the development outlook in the 21st century", 14-15 April, 2016: матер. конфер. - Kyiv, 2016 P.119;

5. Chudina T.O. Physicochemical properties of two types of antigen-loaded PLGA carriers for oral immunization / Kolybo D.V. // X Parnas Conference Young science Forum "Molecules in the Living Cell and Innovative Medicine", 10-12 July, 2016: матер. конфер. - Wroclaw, Poland, 2016 P. 65.;

6. Chudina T.O. Characteristics of PLGA particles for per os immunization // XII Міжнародна наукова конференція студентів і аспірантів "Молодь і поступ біології", 2016: матер. конфер. - м. Львів, 2016 с. 254-5

РОЗДІЛ 5

ФУНКЦІОНАЛІЗАЦІЯ ЧАСТОК НА ОСНОВІ ПОЛІ(D,L-ЛАКТИД-КО-ГЛІКОЛІДУ) З ІММОБІЛІЗОВАНИМ ФРАГМЕНТОМ ДИФТЕРІЙНОГО ТОКСОЇДУ

За результатами попередніх досліджень було показано, що частки PLGA 2* здатні до кращої стимуляції продукції специфічних сироваткових антитіл та менш критично реагують на вплив низького рН середовища, що імітує середовище шлунково-кишкового тракту. У зв'язку з цим подальші дослідження щодо можливості функціоналізації часток іншими ад'ювантними молекулами або їхнє покриття захисним шаром проводились лише на частках PLGA 2*.

Проте проблеми інтенсивної деградації часток та швидкого вивільнення антигену лишаються відкритими. Вирішити їх могло б допомогти покриття полімерних часток захисним шаром, що сповільнюватиме вплив пошкоджуючих факторів до моменту потрапляння частки в компартменти імунної системи слизових, або ж функціоналізація комплексів додатковими ад'ювантними молекулами, що могли б пришвидшити їхнє поглинання імунними клітинами.

5.1 Навантаження часток PLGA 2* ад'ювантними молекулами убіквітину або стафілококового протеїну А

Було підібрано методики синтезу та функціоналізації часток для проведення подальших досліджень. Для досягнення цієї мети, як ад'ювантні молекули нами були використані мічені зеленим флуоресцентним протеїном рекомбінантні протеїни убіквітин (EGFP-Ubq) (є внутрішньоклітинною молекулою, що присутня у всіх клітинах еукаріотів, і в нормі не може знаходитись за її межами) та стафілококовий протеїн А (EGFP-SpA) (є поверхневим протеїном і патогенним фактором бактерій виду *Staphylococcus*

aureus), а також цільовий протеїн – нетоксичний фрагмент ДТ, мічений червоним флуоресцентним протеїном (mCh-SubB). Таким чином, нам вдалось отримати комплекси часток з іммобілізованими ад'ювантними протеїнами на поверхні часток та з інкапсульованим цільовим протеїном всередині:

- PLGA 2*-EGFP
- PLGA 2*-mCh-SubB
- PLGA 2*-mCh-SubB – EGFP-SpA
- PLGA 2*-mCh-SubB – EGFP-Ubq

Синтезовані комплекси були охарактеризовані за навантаження протеїнами шляхом детекції флуоресцентних протеїнів у складі часток методом протокової цитофлуориметрії (рис. 5.1).

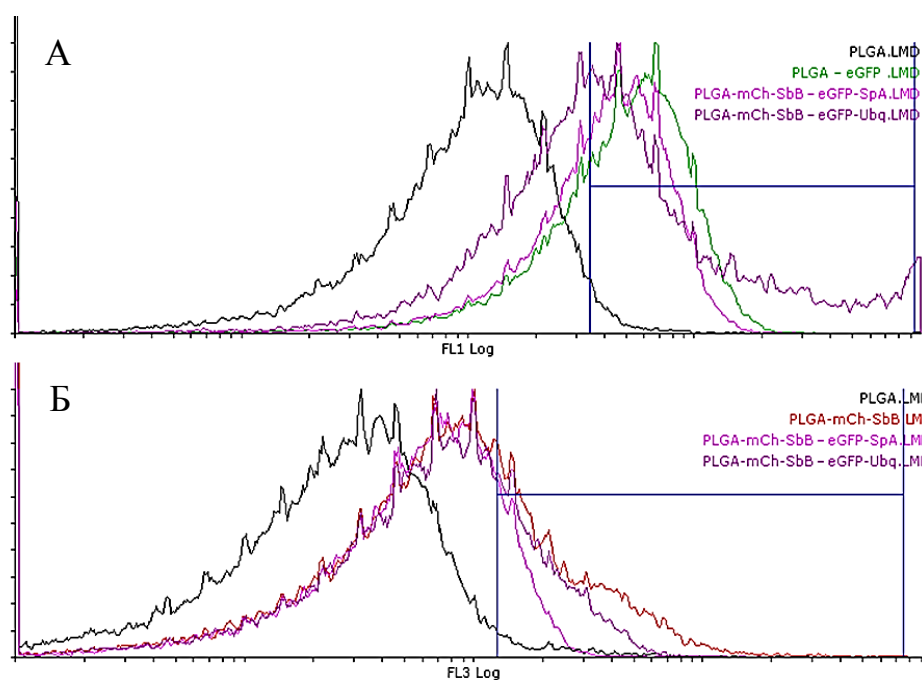


Рисунок 5.1. Розподіл часток PLGA 2* за навантаженням протеїнів: сорбовані ад'ювантні флуоресцентно мічені протеїни EGFP-SpA, EGFP-Ubq, EGFP (А) та інкапсульований флуоресцентно мічений антиген mCh-SubB (Б)

Одержані результати дозволяють стверджувати, що частки містили у своєму складі і червону, і зелену мітки, що свідчить про успішне навантаження як цільовим, так і ад'ювантними протеїнами.

5.2 Покриття часток PLGA 2* захисним шаром на основі хітозану

Також, для покращення стійкості часток до агресивної дії ШКТ розроблена методика їхнього покриття хітозаном. Перевірка синтезованих комплексів на вміст антигену у складі часток показала, що додаткові маніпуляції з частками, пов'язані з покриттям їх шаром хітозану не впливають на кількісний вміст антигену та не спричиняють його передчасному вивільненню (рисунок 5.2).

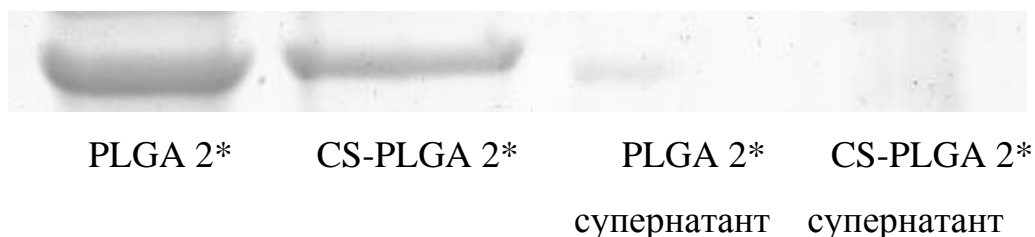


Рисунок 5.2. Електрофореграма, що відображає вміст протеїну EGFP-SubB у складі часток: PLGA 2* – вміст протеїну після синтезу часток PLGA, CS-PLGA 2* – вміст протеїну після покриття часток хітозаном, PLGA 2* супернатант – протеїн, що не іммобілізувався на частки, CS-PLGA 2* супернатант – протеїн, що вивільнився з часток після покриття хітозаном

Також було досліджено вплив наявності захисної оболонки на швидкість вивільнення цільового протеїну. Результати дослідження, що представлені на рисунку 5.3 демонструють різницю перебігу вивільнення протеїнів у часток PLGA 2* та часток вкритих хітозаном CS-PLGA 2*. Так, крива що представляє результати для CS-PLGA 2* має лінійний характер, що

говорить про рівномірність деградації часток в часі та поступовий вихід антигену в часі. В той час як для часток PLGA 2* відмічено вивільнення практично 70% протеїну в перші 6 днів.

Продемонстровані відмінності виходу антигену для часток вкритих хітозаном можуть мати вплив на їхню імуногенність при використанні для пероральної імунізації. До того ж такі результати помірному виходу інкапсульованого протеїну можуть мати важливе значення для створення на їхній основі препаратів, що здатні індукувати толерантність до протеїну.

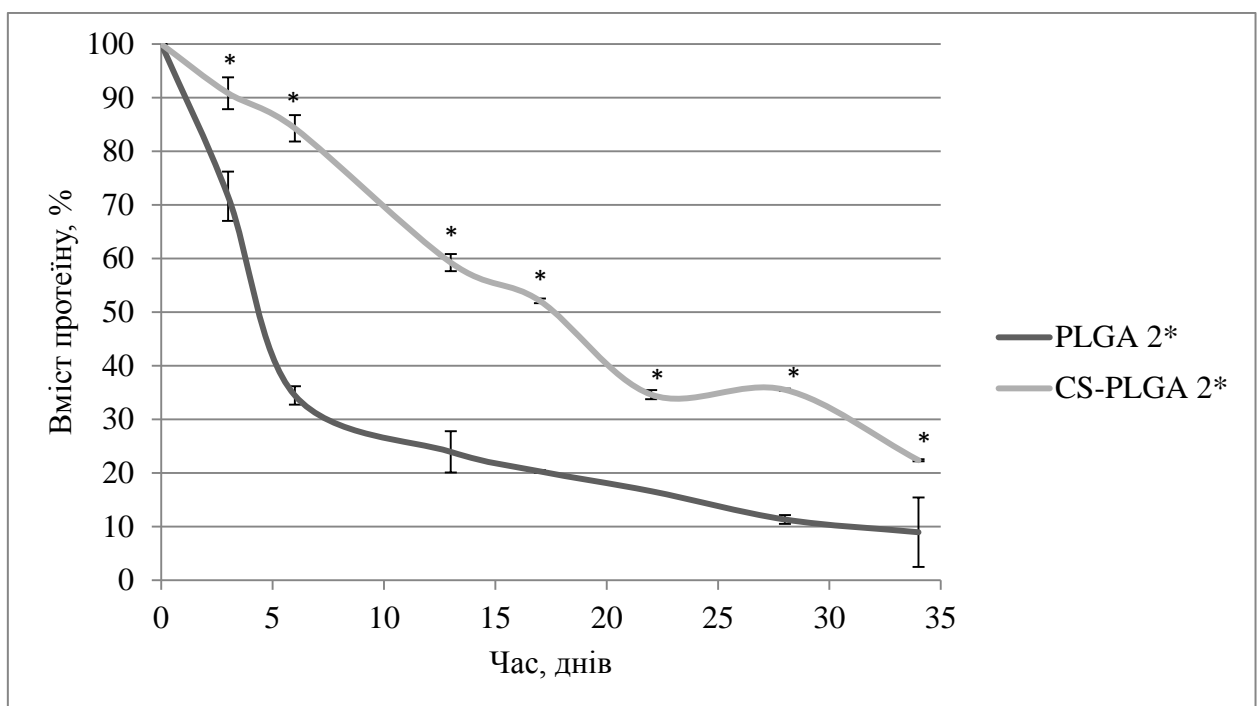


Рисунок 5.3. Динаміка вивільнення протеїнів з часток PLGA 2* та часток вкритих хітозаном CS-PLGA 2* протягом 34 днів при 37°C. За 100% прийнято вміст протеїну в частках в 1 день експерименту ($M \pm S$, $n=3$).

* $P \leq 0,05$ у порівнянні з групою часток PLGA 2* що інкубувались протягом такого ж часу.

Були, також, досліджені антитілоstimулюючі властивості комплексів після покриття та функціоналізації та визначено, що частки вкриті хітозаном найкраще стимулювали індукцію антитіл класу G після 3 імунізації, проте

достовірного впливу функціоналізації часток рекомбінантними протеїнами EGFP-Ubq та EGFP-SpA відмічено не було (рис. 11).

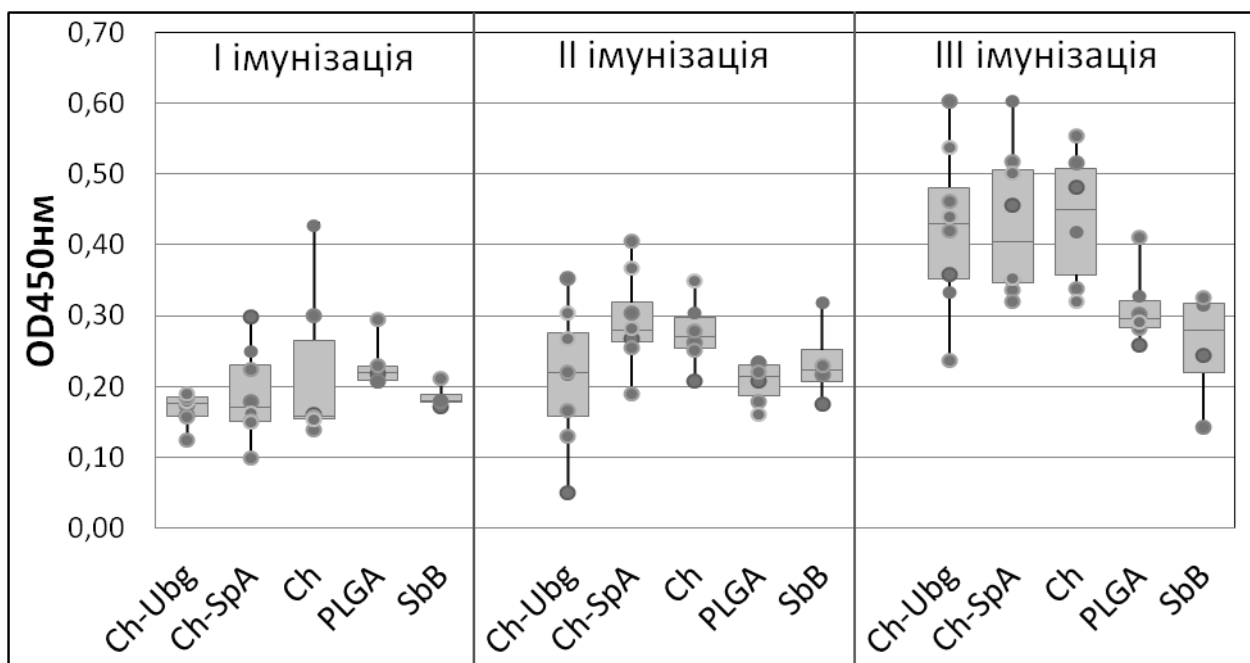


Рисунок 5.4. Рівень антитіл класу G до субодиниці B ДТ в сироватці крові мишей, імунізованих контрольним протеїном EGFP-SubB (SubB), частками PLGA з іммобілізованим антигеном – EGFP-SubB (PLGA), частками PLGA вкритими хітозаном (Ch) та частками PLGA вкритими хітозаном та функціоналізованими протеїнами EGFP-Ubq (Ch-Ubq) або протеїнами EGFP-SpA (Ch-SpA).

5.3 Визначення перспективних ад'ювантних молекул для функціоналізації часток

Позитивні результати функціоналізації часток демонструють можливість використання додаткових молекул для підсилення імунної відповіді. Саме тому нами було проведено визначення можливих ад'ювантних молекул, що могли б підсилити індукцію імунної відповіді до цільового антигену – дифтерійного токсину.

5.3.1 Дослідження змін в експресії proHB-EGF, як цільової молекули для зв'язування з ДТ

Завдяки взаємодії SubB з EGF-подібним доменом proHB-EGF відбувається проникнення в клітину ензиматичноактивної субодиниці ДТ – субодиниці А (SubA), що призводить до зупинки синтезу протеїну та загибелі клітини. proHB-EGF експресується на клітинах імунної системи: макрофагах, CD4⁺ Т-клітинах та В-клітинах, які принципово відрізняються за своїми функціями. При цьому особливості експресії proHB-EGF на різних типах клітин імунної системи досі лишаються маловивченими. Саме тому цікавим було дослідити зміни в експресії proHB-EGF на клітинах ліній, що походять від макрофагоподібних клітин і В-лімфоцитів, під впливом різних активуючих чинників.

5.3.1.1 Дослідження експресії proHB-EGF на поверхні клітин імунної системи за стандартних умов культивування *in vitro*.

На першому етапі проводили дослідження експресії proHB-EGF на клітинах ліній J774, Raji і KG-1 без впливу додаткових чинників за допомогою вимірювання флуоресценції ліганду EGFP-SubB.

На рис. 5.5 представлено результати цитофлуориметричного аналізу клітин, забарвлених EGFP-SubB або EGFP (контроль на неспецифічну сорбцію), де за нормальний сигнал було прийнято рівень автофлуоресценції клітин, які не були забарвлені. Клітини ліній J774 і Raji зв'язували ліганд proHB-EGF – EGFP-SubB, а клітини лінії KG-1 не зв'язували EGFP-SubB (зв'язували його на рівні неспецифічної сорбції).

Очевидно, що найбільшу кількість proHB-EGF на поверхні експресували клітини Raji (зростання флуоресценції у 3 рази порівняно з контролем), а клітини J774 експресували меншу кількість proHB-EGF (зростання

флуоресценції у 1,5 - 2 рази порівняно з контролем). Подальші дослідження проводились на клітинах 3 ліній, що походять від імунних клітин, з різним вихідним рівнем експресії proHB-EGF: високим (Raji), низьким (J774) і практично нульовим (KG-1). Клітини лінії KG-1 були використані як контрольні, та в подальших експериментах вони не реагували на активуючі фактори зміною рівня експресії proHB-EGF.

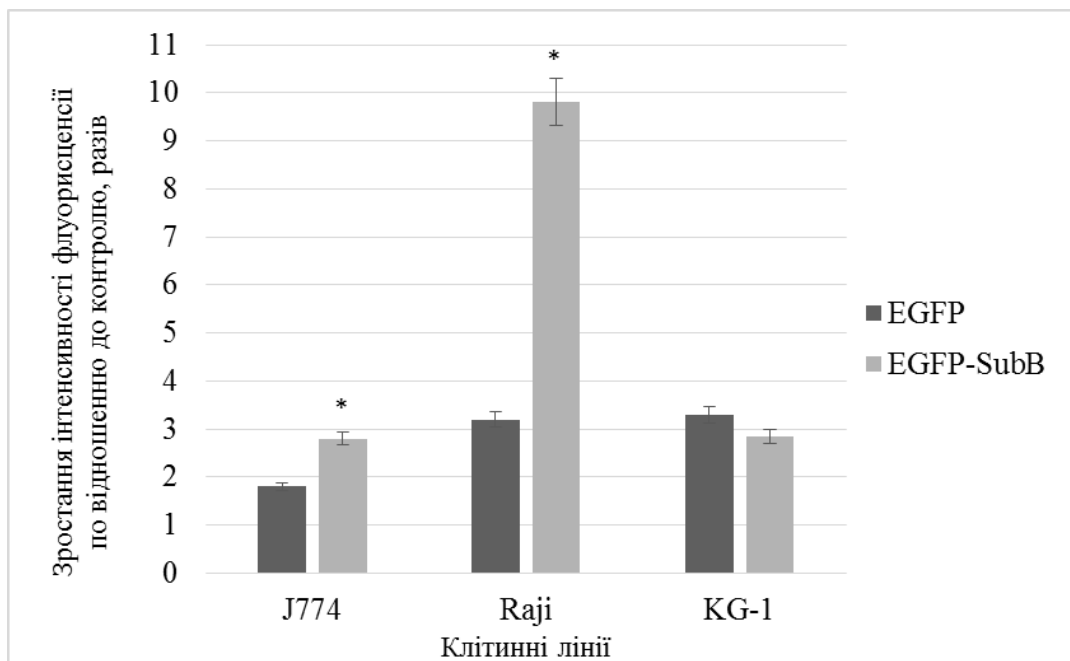


Рисунок 5.5. Інтенсивність флуоресценції клітин Raji, J774, KG-1, забарвлених EGFP-SubB та EGFP, по відношенню до контролю (незабарвлених клітин). ($M \pm SE$, $n=5$).

* $P \leq 0,05$ у порівнянні з значеннями взаємодії клітин з контрольними протеїном EGFP

5.3.1.2 Дослідження експресії proHB-EGF на поверхні клітин імунної системи при дії активуючих факторів: ЛПС, CRM197 або rsHB-EGF.

Додавання ЛПС сприяло підвищенню рівня експресії proHB-EGF клітинами лінії J774 (збільшення більш ніж в 2 рази порівняно з контролем)

та незначному зниженню рівня експресії proHB-EGF клітинами лінії Raji (рис. 5.6).

Культивування клітин J774 і Raji у присутності rsHB-EGF призводило до протилежних ефектів (рис. 5.7): експресія proHB-EGF на клітинах J774 зростала в 1,3 рази, а на клітинах Raji – на стільки ж знижувалась. Культивування у присутності аналога ДТ (CRM197) практично не впливало на експресію proHB-EGF клітинами J774, однак стимулювало зростання експресії proHB-EGF (в 1,3 рази) клітинами Raji.

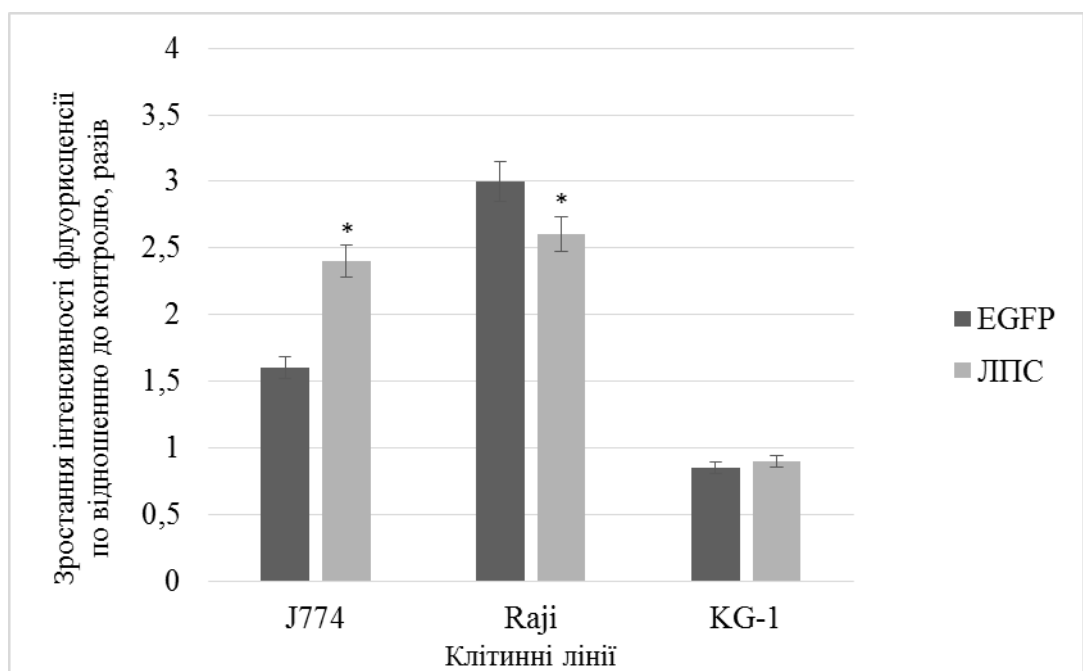


Рисунок 5.6. Інтенсивність флуоресценції клітин Raji, J774 та KG-1, забарвлених EGFP-SubB та EGFP, по відношенню до контролю (незабарвлених клітин) в залежності від присутності у культуральному середовищі мітотичного фактору ЛПС. ($M \pm SE$, $n=5$).

* $P \leq 0,05$ у порівнянні з значеннями взаємодії клітин з контрольними протеїном EGFP

Цікавим виявився факт, що нетоксичний аналог ДТ – рекомбінантний протеїн CRM197 не впливав на експресію proHB-EGF клітинами J774 і підвищував експресію proHB-EGF клітинами Raji. Ймовірно, це пов'язано з

різною видовою приналежністю клітин: клітини людини (Raji) є чутливими, а клітини миші (J774) є резистентними до ДТ. Нами було показано, що ДТ зв'язується з proHB-EGF на клітинах як чутливих, так і нечутливих до нього організмів, що призводить до інтерналізації комплексу. Однак, в клітинах нечутливих до ДТ організмів не відбувається транслокація субодиниці А з ендосом до цитозолу, що, ймовірно, пов'язано з впливом Т-домену ДТ на рН ендосом.

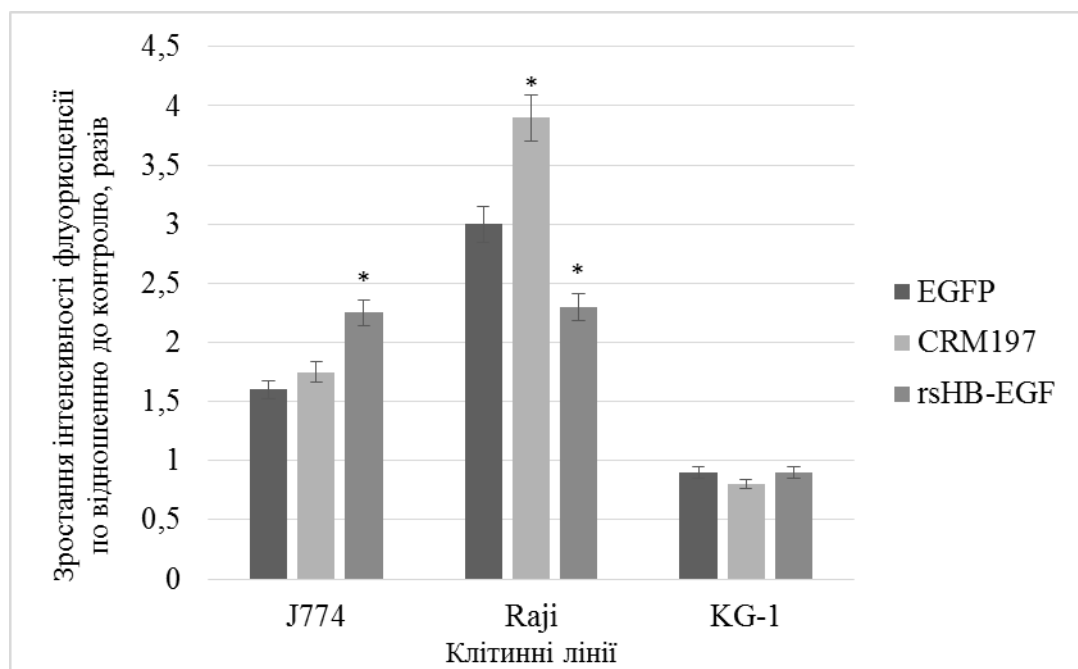


Рисунок 5.7. Інтенсивність флуоресценції клітин Raji, J774 та KG-1, забарвлених EGFP-SubB та EGFP, по відношенню до контролю (незабарвлених клітин) в залежності від присутності у культуральному середовищі рекомбінантних протеїнів: нетоксичного аналогу дифтерійного токсину CRM197 або аналогу розчинної форми HB-EGF – rsHB-EGF. ($M \pm SE$, $n=5$).

* $P \leq 0,05$ у порівнянні з значеннями взаємодії клітин з контрольними протеїном EGFP

Для клітин миші є характерною значно менша спорідненість взаємодії ДТ з proHB-EGF, пов'язана з міжвидовими відмінностями у амінокислотних

послідовностях proHB-EGF та CD9 – асоційованого з proHB-EGF трансмембранного протеїну, який у миші не здатний підсилювати зв'язування ДТ з proHB-EGF. Ймовірно, що ці особливості впливають на передачу сигналу від рецептору proHB-EGF після зв'язування з CRM197, який призводить до підвищення експресії proHB-EGF лише на клітинах людини.

В таблиці 5.1 узагальнено дані щодо змін в експресії proHB-EGF на поверхні клітин J774 і Raji (клітини KG-1 були контрольними) під впливом різноманітних активуючих факторів: підвищення щільності клітин в культурі, збільшення концентрації FBS, присутності в культуральному середовищі ЛПС, CRM197 або rsHB-EGF.

Таблиця 5.1.

Зміни в експресії proHB-EGF на поверхні клітин ліній J774 і Raji під впливом активуючих факторів

Клітинна лінія	J774	Raji
Походження	Макрофаги миші	В-клітини людини
ЛПС	+	--
CRM197		+
rsHB-EGF	+	–

Прим. + підвищення експресії proHB-EGF; – зниження експресії proHB-EGF; відсутність позначки – відсутність змін у експресії proHB-EGF.

5.3.2 Отримання рекомбінантних scFv-антитіл злитих із фрагментом SpA

Ще одним підходом для покращення ад'ювантних властивостей комплексу є використання рекомбінантних антитіл (одноланцюгових варіабельних фрагментів антитіл scFv) специфічних до рецептору ДТ, що

могли б застосовуватись для створення систем ціленаправленої доставки лікарських засобів.

5.3.2.1 Отримання модифікованого вектору рЕТ-22b-SpA.

Для отримання модифікованого вектору, який містив би послідовність, що направляє протеїн в периплазму, де можливе утворення стабільних дисульфідних зв'язків, використовували плазмиду рЕТ-22b, яка містить послідовність *PelB* (рис. 5.8, А). Для цього фрагмент раніше отриманої конструкції *pET-28c-SpA*, що містить послідовність D-E-A-A' протеїна А та сайт для ендонуклеази рестрикції *SfiI*, було вбудовано у вектор *pET-22b* за сайтами для ендонуклеаз рестрикції *NcoI* та *NotI*. Отриманою лігазною сумішшю трансформували клітини *E. coli* DH10В та відбирали клон, що несе цільову конструкцію (рис. 5.8, Б). В результаті було отримано універсальну генетичну конструкцію на основі вектора *pET-22b* для отримання scFv-антитіл, об'єднаних з протеїном А.

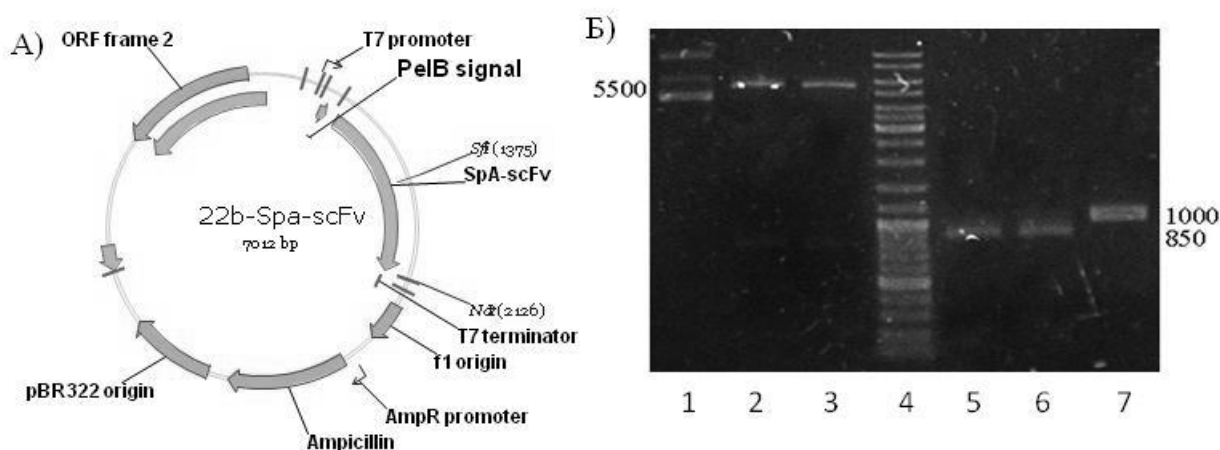


Рисунок 5.8. Схема конструкції рЕТ-22b-SpA-scFv (А); одержання вектору рЕТ-22 b -SpA (Б): 1 – виділений вектор рЕТ-22b, 2, 3 – вектор рЕТ-22b, гідролізований ендонуклеазами рестрикції *NcoI* та *NotI*; 4 – маркери; 5,6 – фрагмент гену протеїна А, оброблений ендонуклеазами рестрикції *NcoI* та

NotI; 7 – фрагмент гену протеїна А, ампліфікований з конструкції рЕТ-28с-SpA.

5.3.2.2 Отримання злитого протеїну SpA-scFv-7E у векторі рЕТ-22b.

З протеїном А, розміщеним у векторі рЕТ-22b, об'єднували ДНК-послідовності scFv-7E антитіл, що є специфічними до HB-EGF. Послідовність scFv виділяли з фагмідного вектора шляхом гідролізу ендонуклеазами рестрикції *SfiI* та *NotI*, після чого їх вбудовували в отриману конструкцію рЕТ-22b-SpA. Отриманою лігазною сумішшю трансформували клітини *E. coli* DH10B та відбирали клони, що несли цільову конструкцію (рис.5.9).

Одержані клони-продуценти аналізували електрофорезом у поліакриламідному гелі щодо здатності продукувати цільовий протеїн. Досліджувалися виділені з клітин розчинні та нерозчинні фракції.

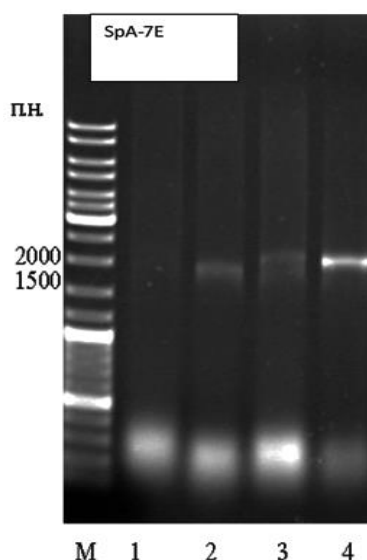


Рисунок 5.9. Аналіз клонів, трансформованих рЕТ-22b-SpA із послідовністю гену scFv-7E антитіл методом ПЛР: 1-4 – клони, трансформовані рЕТ-22b-SpA із послідовністю гену scFv; М – маркери.

В лізатах продуцентів на електрофореграммі можна визначити відповідні цільові протеїни з очікуваною молекулярною масою для вільних scFv-антитіл близько 30 кДа, і scFv, злитих з протеїном А (близько 63 кДа) (рис. 5.10, А). Імуноблотинг з використанням моноклональних антитіл проти гістидинового тагу підтвердив наявність у клітинних лізатах цільового рекомбінантного протеїну, при чому і в розчинній, і в нерозчинній фракціях (рис. 5.10, Б).

Згідно розрахунків, проведених за допомогою програми TotalLab, для продуцента scFv-7E-SpA частка цільового протеїна, який продукується в розчинній формі, становила близько 36%.

Для підтвердження збереження ф'южену scFv-SpA своїх функцій був проведений імуноензимний аналіз, результати якого показали, що злитий протеїн продемонстрував ефективне розпізнавання цільового антигену та не розпізнавав сироватковий альбумін бика (рис. 5.11). Це свідчило про збереження антигензв'язувальної функції у scFv.

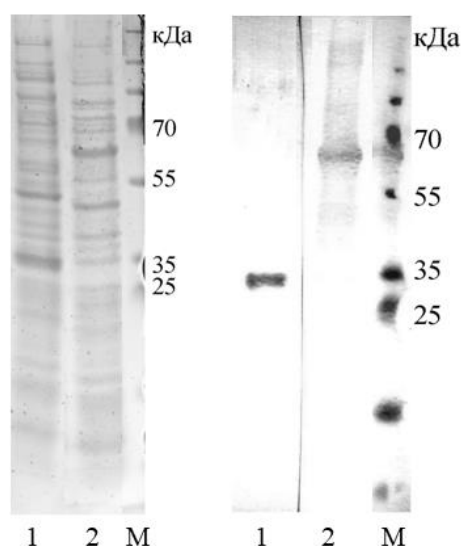


Рисунок 5.10. Електрофореграма (А) та блотограма (Б) клітинних лізатів продуцентів вільних і злитих з фрагментом протеїна А scFv-антитіл, субклонуваних у векторі рЕТ-22b: 1 – вільні scFv-7E, 2 – SpA-scFv-7E, М – маркери. Імуноблотинг проведено з антитілами до his-тагу, кон'югованих із пероксидазою хрому.

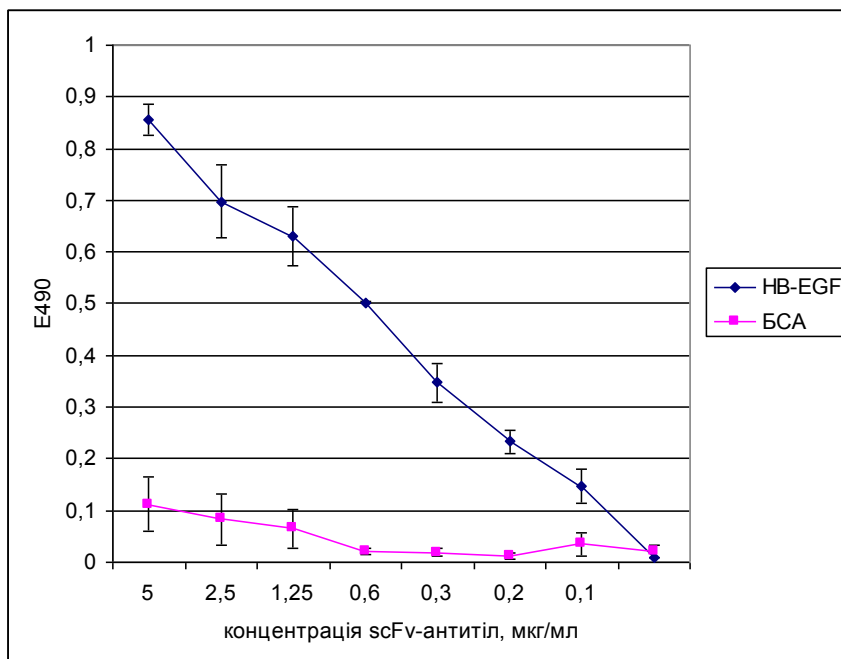


Рисунок 5.11. Імуноензимний аналіз scFv-антитіл 7E, злитих з протеїном А: БСА – сироватковий альбумін бика. Планки похибок відображають стандартне відхилення. Достовірно по відношенню до контрольних результатів з БСА ($p \leq 0,05$).

5.4 Висновки до розділу

1. Підібрано методики синтезу та функціоналізації часток PLGA 2* та підтверджено можливість їхнього успішного навантаження, як цільовим, так і ад'ювантними протеїнами
2. Проведено додаткове покриття часток PLGA 2* хітозаном та показано, що додаткові маніпуляції з частками, пов'язані з покриттям їх шаром хітозану не впливають на кількісний вміст антигену та не спричиняють його передчасному вивільненню, а навіть навпаки сприяють сповільненню виходу антигену в часі
3. Проведено визначення перспективних ад'ювантних молекул для функціоналізації часток, що могли б підсилити індукцію імунної відповіді до цільового антигену – дифтерійного токсину

Основні наукові результати розділу опубліковані в роботах:

1. Chudina T.O., Galkin O.V., Siromolot A.A., Oliynyk O.S. Increasing the efficiency of the expression of recombinant scFv-antibodies. *Biotech. Acta.* 2017, 10(5): 19-29. *(Особистий внесок здобувача: субклонування послідовностей scFv у векторі рЕТ-22в, виділення та очистка рекомбінантних протеїнів, обробка та узагальнення результатів, оформлення рукопису)*
2. Chudina T.O., Labyntsev A.Y., Romaniuk S.I., Kolybo D.V., Komisarenko S.V. Changes of proHB-EGF expression after functional activation of the immune system cells. *Ukr. Biochem. J.* 2017, 89(6): 33-40. *(Особистий внесок здобувача: виділення та очистка рекомбінантних протеїнів, культивування клітинних ліній, підготовка матеріалу для дослідження взаємодії з культурами клітин, обробка та узагальнення результатів, оформлення рукопису)*
3. Chudina T.O. Physic-chemical characterization of PLGA adjuvants for immunization per os / Kolybo D.V. // FEBS YSF (Young Scientists Forum) and Congress, 2016 матер. конфер. - Kuschadasy, Turkey, 2016. P. 146.

АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ ОТРИМАНИХ РЕЗУЛЬТАТІВ

Більшість бактеріальних патогенів потрапляють в організм через слизові оболонки, а отже імунна відповідь в слизових є визначальним захисним фактором. Поглиблення знань щодо особливостей розвитку імунної відповіді у слизових відкриває нові можливості для розробки пероральних вакцин, які матимуть локальний імуностимулюючий ефект в слизових. При розробці таких вакцин найбільш важливими проблемами є вибір способу доставки антигену, захист антигенного матеріалу від дії пошкоджуючих факторів внутрішнього середовища організму та вибір безпечних ад'ювантів для підсилення імунної відповіді в слизових. Головним фактором патогенності збудника дифтерії є дифтерійний токсин, який продукується бактерією в місцях колонізації на слизових оболонках дихальних шляхів. Отже індукція потужного антитоксичного імунітету в слизових потенційно здатна захистити організм від інфекції.

Пероральний шлях введення найбільш часто використовується для доставки лікарських препаратів [53]. Протягом майже століття багато досліджень були зосереджені на розробці пероральних вакцин, як маршрутів імунізації проти кишкових патогенів. Використання слизових маршрутів введення вакцин, особливо пероральний шлях, може підвищити економічну цінність вакцини і зробити вакцинування більш безпечним і легким, не потребуючи задіяння медичного персоналу [54]. Що ще більш важливо, вакцинація через слизові може викликати імунну відповідь як системно, так і на слизових поверхнях, яка слабо задіяна при парентеральній імунізації [55].

Досягнення нанотехнології можна використовувати для розробки вакцин направлених на слизові оболонки, при цьому здійснюючи індукцію бажаної імунної відповіді та захищаючи протеїновий компонент вакцини. Питання про ефективність ад'ювантних властивостей частинок різної природи, механізми їхнього розпізнавання імунною системою та їхній подальший трафік в організмі зараз активно досліджуються.

В якості носіїв для антигену користуються різноманітними нано- та мікродіафрагментами, створеними на основі полімерів, металів, ліпідів, ліпополісахаридів тощо [3, 8]. Проте ад'ювантні та фізико-хімічні властивості усіх цих носіїв досить різні, і тому їхня взаємодія з антигеном і поведінка у ШКТ теж може відрізнятися. Саме тому, для досягнення якомога ефективніших результатів потрібно порівняти здатність викликати імунну відповідь певного антигену, кон'югованого з частками різного походження.

Використовуючи різні підходи та методи синтезу, нами було отримано 5 типів часток різної хімічної природи з іммобілізованим рекомбінантним фрагментом дифтерійного токсоду (EGFP-SubB) виходячи з різних фізико-хімічних властивостей та здатності до біодеградації одержаних комплексів, а саме: два типи наночасток на основі золота середнього (Gold 1) та великого (Gold 2) розмірів; частки на основі фосфату кальцію (CaP); частинки на основі полі(D,L-лактид-ко-гліколіду) (PLGA) методом подвійної емульсифікації з подальшим випаровуванням органічної фази (PLGA 1) та методом заміщення розчинника з подальшим випаровуванням органічної фази (PLGA 2) [124].

Синтезовані частки з іммобілізованим на них антигеном SubB перш за все аналізували на ефективність його включення, адже саме ця характеристика є ключовою для розрахунку дози препарату та може мати вплив на його імуногенність. Для оцінки використовували два параметри, такі як ефективність іммобілізації протеїну (EI) та навантаження часток (НЧ). Найбільшу EI продемонстрували частки CaP, що сорбували на собі практично 90% доданого протеїну, а от найнижчу ефективність включення антигену продемонстрували частки Gold 1 та Gold 2 (24% та 27% відповідно). В той час як за НЧ найкращі результати продемонстрували частки Gold 1 та Gold 2 (6,35% та 8,30% відповідно), а от найнижчі значення відмічено для PLGA 1 та PLGA 2 часток (0,15% та 0,50% відповідно). Така відмінність між ефективністю іммобілізації та навантаженням часток може пояснюватись різницею у розмірах часток, а відповідно і площею зв'язування антигену.

Саме тому наступним етапом характеристики часток було дослідження їхніх розмірів та форми.

Морфологічні особливості часток оцінювали за допомогою електронної мікроскопії. За результатами досліджень можна говорити, що усі синтезовані частки мали симетричну округлу форму, при цьому частки, створені на основі золота, мали найменші розміри (розміром 9 та 16 нм відповідно для Gold 1 та Gold 2) і фактично є наночастками. Цікавим було дослідити саме такі розміри часток Gold, адже за літературними даними є відмінності впливу часток на імунну систему в залежності від їхнього розміру. Створені на основі фосфату кальцію частки також мали симетричну круглу форму, проте виявились дещо більшими. Найбільшими, хоча й умовно, можна назвати частинки PLGA 1 – 10-100 нм. Синтезовані за різними методами частинки PLGA мали схожий розмір, хоча використання методу 2 давало більш гомогенні частинки порівняно з частинками синтезованими за методом 1.

Надалі усі кон'югати було перевірено на їхній можливий цитотоксичний вплив по відношенню до різних клітин організму *in vitro*. Для цього було використано 2 типа клітинних ліній: клітини лінії U937, що мають властивості моноцитів та клітини лінії L929, що мають властивості клітин фібробластів. З використанням МТТ тесту для визначення життєздатності клітин показано дозозалежну токсичність наночасток Gold 1 та Gold 2 для клітин ліній L929 та U937, ці частки починаючи з концентрації 1 мг/мл знижували життєздатність обох типів клітин. Було також відмічено цитотоксичний вплив часток CaP на макрофагоподібні клітини лінії U937 починаючи з концентрації 10 мг/мл та його відсутність на клітини лінії L929. Такий ефект часток CaP може бути пов'язаний з різним типом клітин, що може зумовлювати різну відповідь клітин на дію таких часток. Частки на основі PLGA суттєвого цитотоксичного ефекту у досліджуваних концентраціях не виявили, проте продемонстрували незначний вплив на ріст клітин в культурі, який, ймовірно, пов'язаний зі значним об'ємом, який займали дані частки в інкубаційному середовищі.

Надалі, для часток що чинили цитотоксичний ефект на клітини ліній L929 та U937 було проведено розрахунки напівлетальних доз IC_{50} , які для клітин лінії L929 становили: IC_{50} (Gold 1) = 1,97 мг/мл та IC_{50} (Gold 2) = 0,76 мг/мл; а для клітин лінії U937 напівлетальні дози наночасток становили: IC_{50} (Gold 1) = 1,51 мг/мл, IC_{50} (Gold 2) = 1,55 мг/мл та IC_{50} (CaP) = 6,93 мг/мл. Виходячи з отриманих даних, можна відзначити схожість значень IC_{50} для обох типів часток Gold 1 та Gold 2 та відмітити їхній значний цитотоксичний вплив на фагоцитарні клітини лінії U937, що виявився майже у 5 разів більший у порівнянні з частками CaP. Вплив часток золота на клітини лінії L929 дещо відрізнявся, що проявилось у токсичності часток Gold 2, що майже втричі перевищувала вплив часток Gold 1.

Серед шляхів загибелі клітин можливо виділити апоптоз та некроз. Варто відмітити, що апоптоз є нормальним процесом у життєдіяльності організму та його наслідки локалізуються макрофагальними клітинами, некроз навпаки є процесом патологічним та призводить до негативних ефектів від запалення до загибелі організму. Саме тому цікавим було дослідити шлях загибелі клітин після дії часток що викликають цитотоксичні ефекти. Проте, виражений як апоптичний, так і некротичний ефект часток може ускладнювати їхнє подальше використання для імунізації.

З використанням методу протокової цитометрії показано, що наночастки Gold 1 викликають переважно некроз у культурі обох ліній клітин L929 та U937, в той час як наночастки Gold 2 викликають переважно некроз у U937, але їхній вплив на клітини лінії L929 виражається переважно у індукції апоптичної загибелі клітин. Для обох типів клітин показана залежність між розміром золотих часток та їхньою здатністю викликати апоптоз у культурі. Частки CaP показали також високу здатність викликати апоптичну загибель клітин лінії U937.

Надалі усі кон'югати перевірено на здатність до взаємодії з антиген-презентувальними клітинами *in vitro*. Для виявлення закономірностей прояву ад'ювантних властивостей часток, як носіїв антигенів було досліджено

процеси їхньої взаємодії з макрофагоподібними клітинами лінії J774, а саме ефективність їхньої сорбції та ефективність поглинання клітинами. В якості позитивного контролю на фагоцитарну активність клітин J774 використовували бактерії *E. coli*, що містили в собі флуоресцентний протеїн EGFP.

З результатів дослідження показано, що всі типи часток з іммобілізованим антигеном здатні взаємодіяти з макрофагоподібними клітинами лінії J774. Дослідження динаміки цієї взаємодії показало, що для більшості часток взаємодія з клітинами відбувається протягом 1 години від початку спільної інкубації. Встановлено, що клітинами лінії J774 найкраще фагоцитуються частки на основі полі(D,L-лактид-ко-гліколіду) (PLGA 1 та PLGA 2), менш ефективно – наночастки золота Gold 1, а наночастки фосфату кальцію CaP та золота Gold 2 лише взаємодіють з поверхнею клітин, проте не поглинаються клітинами. Варто відмітити, що частки Gold 2 відрізнялися від інших видів часток за характером взаємодії з клітинами: вони добре зв'язувались з клітинами при 4°C, але протягом 1 години інкубації за температури 37°C кількість часток, що взаємодіяли з клітинами, помітно зменшувалася. Можливо, наночастки золота такого розміру здатні проникати в клітини іншими шляхами, відмінними від фагоцитозу. Також цікавим виявився характер взаємодії часток CaP з клітинами: при інкубації протягом 1 години за температури 37°C спостерігалось посилення їхньої взаємодії з клітинами, однак, вірогідно, що частки не проникали всередину клітин, а лише зв'язувались з їхньою поверхнею, як і частки Gold 2. Можливо, тривалість інкубації виявилася недостатньою для поглинання цих видів часток, або зв'язування з мембраною перешкоджало нормальному проходженню процесу фагоцитозу. Навіть протягом 2-ої години інкубації кількість часток CaP зв'язаних з клітинами J774 продовжувала збільшуватись.

Найкраще фагоцитувались частки PLGA обох типів, при цьому їхні результати перевершують значення позитивного контролю (фагоциткування

бактерій *E. coli*). Цей факт підтверджує ад'ювантні властивості полі(D,L-лактид-ко-гліколіду), а відсутність цитотоксичного ефекту часток на клітинні лінії підтверджують переваги використання цих часток у якості ад'юванту для створення пероральних вакцин.

На наступному етапі виконання дисертаційної роботи було дослідження *in vivo* імуногенних властивостей часток різного розміру та хімічної природи з іммобілізованим на них рекомбінантним фрагментом дифтерійного токсоїду шляхом визначення змін гуморального імунітету. Для визначення здатності кон'югатів часток з антигеном формувати специфічну імунну відповідь проти введеного антигену за пероральної імунізації було проведено імунізацію *per os* експериментальних тварин та досліджено вміст специфічних до антигену сироваткових антитіл класу G, що забезпечують тривалий гуморальний імунітет, та специфічних антитіл класу A, що формують місцевий імунітет слизових оболонок.

За результатами імуноензимного аналізу було показано, що концентрації антитіл IgA у крові, порівняно з контролем, помітно збільшились вже після другої імунізації у груп мишей, які отримували антиген, кон'югований з носіями PLGA 1 та PLGA 2, а також Gold 2. У групі мишей, що отримували PLGA 2, відмічено також збільшення концентрацій IgG у крові після третьої вакцинації.

Отримані дані вказують на перспективність використання часток PLGA 1 та PLGA 2, як можливих носіїв антигену для створення пероральної форми доставки вакцинних препаратів. Цей тип часток не чинив цитотоксичного впливу на клітини навіть у надвисоких концентраціях. За результатами проточної цитометрії та конфокальної мікроскопії було показано їхню здатність до сорбції та проникнення у фагоцитарні клітини. Також, частки PLGA показали найкращі результати у якості ад'ювантів *in vivo* та чинили вплив на синтез специфічних антитіл класів A та G до іммобілізованого антигену [125]. Саме тому подальші дослідження щодо

детальних характеристик кон'югатів, підбору дозувань та схем імунізацій проводили лише для часток PLGA.

У зв'язку з тим, що частки синтезовані на основі PLGA здатні контролювано вивільняти біологічні молекули, які в них містяться, ми вирішили модифікувати методику синтезу часток PLGA 2, засновану на принципі подвійної емульсифікації з використанням методу випаровування розчинника таким чином, що антиген інкапсулюється всередині часток [126].

При проведенні кон'югації з цільовим антигеном були внесені зміни співвідношень протеїна та часток, завдяки чому вдалося збільшити ефективність посадки антигену на часточки порівняно з попереднім разом. Виходячи з отриманих даних, можна стверджувати, що нам вдалося збільшити ефективність іммобілізації антигену у 1,5 разів та у 2,5 рази порівняно з попередніми результатами для PLGA 1 та PLGA 2 часток відповідно. Гарні результати були отримані і для показника навантаження часток, що зросли і для PLGA 1 і для PLGA 2 часток (у 44 та 16 разів відповідно). Змінились, також, і розміри часток. Проте їхнє порівняння є досить умовним, адже методики визначення розмірів використовувались різні. Такі оптимізації дозволяють збільшити навантаження часточок, що в свою чергу може вплинути на збільшення ефективності формування імунної відповіді на цільовий антиген.

Більш детальні дослідження розмірів часток були проведені двома різними методами: NTA та ЛКС. Одержані результати незначно відрізнялися, однак демонстрували певну закономірність. Можна відмітити розподіл пулу часток які відрізняються за розмірами, при цьому переважна більшість часток PLGA 1* мають розміри 81,4 нм, а PLGA 2* - 155,9 нм. Можна припустити, що такий розподіл є результатом утворення конгломератів.

Результати електронної мікроскопії часток PLGA підтвердили припущення щодо наявності конгломератів. Поодинокі частки мають округлу правильну форму, їх розміри знаходяться в межах розмірів, визначених за даними NTA та ЛКС. Однак на мікрофотографіях помітні, як поодинокі

частинки, так і більші за розміром утворення, які, швидше за все, є конгломератами окремих частинок, при цьому PLGA 2* частки мали більш гомогенний розподіл, в той час як суспензія часток PLGA 1* містила великі скупчення часток. Такі результати можна пояснити відмінностями у процесах синтезу цих часток. Так, при створенні часток PLGA 2* використовуються більш інтенсивні методи змішування суспензії з використанням ультразвукового дезінтегратора, в той час як методика синтезу PLGA 1* передбачає більш м'яке змішування суспензії з використанням магнітної мішалки.

Важливим фактором для досягнення найкращих результатів вакцинації є правильний підбір дозування антигену та періодичності проведення імунізацій. Пояснюється це тим, що неправильно підібрана схема імунізацій може призвести до ігнорування антигену імунною системою як місцево, так і системно. Саме тому, при вакцинуванні слизових є значною проблемою стимуляція захисного імунітету у відповідь на введений антиген, а не розвиток толерантності до нього. Отже на наступному етапі була проведена оцінка ефективності прояву імуногенних властивостей кон'югованого з частками PLGA 1* та PLGA 2* антигену в залежності від дози і періодичності їхнього введення.

Отримані дані вказують, що для стимуляції продукції специфічних проти цільового антигену антитіл класу G з використанням часток полі(D,L-лактид-ко-гліколіду) першого та другого типу оптимальна доза для імунізації *per os* становить 250 мкг/кг. При цьому PLGA 2* ефективніше стимулюють утворення специфічних антитіл. Варто відзначити, що проведення двох етапів імунізацій є достатнім та оптимальним для індукції збільшення синтезу специфічних антитіл класу G.

На синтез IgA істотний вплив мали частки PLGA 1* з концентрацією сорбованого антигену 2,5 мкг/кг, що максимально стимулювали синтез антитіл після другого введення з періодичністю в 2 тижні; та PLGA 2* з концентрацією антигену 25 мкг/кг, що мали вплив вже після першого їхнього

введення та з концентраціями антигену 250 мкг/кг та 250 мкг/кг, що з кожним введенням збільшували рівні синтезу специфічних антитіл.

Підводячи підсумки, можна сказати, що найбільш ефективний вплив на синтез специфічних проти протеїна SubB антитіл класів G та A мали частки на основі PLGA 2* з іммобілізованим антигеном, що у дозуванні антигену в 250 мкг/кг здатні значно збільшувати їхній вміст вже після першої імунізації. Саме тому подальші дослідження були зосереджені саме на цих частках.

Були проведені також дослідження швидкості вивільнення антигену з PLGA часток за впливу середовища з різним рН. Отримані дані свідчать про досить інтенсивну деградацію часток та негативний вплив кислого рН середовища на швидкість вивільнення антигену з часток PLGA.

Вирішити проблему інтенсивної деградації часток та швидкого вивільнення антигену могло б допомогти покриття полімерних часток захисним шаром, що сповільнюватиме вплив пошкоджуючих факторів до моменту потрапляння частки в компартменти імунної системи слизових, або ж функціоналізація комплексів додатковими ад'ювантними молекулами, що могли б пришвидшити їхнє поглинання імунними клітинами.

У якості перспективних молекул для підсилення ад'ювантних властивостей часток та перевірки можливості функціоналізації часток були використані мічені зеленим флуоресцентним протеїном рекомбінантні протеїни убіквітин (EGFP-Ubq) та стафілококовий протеїн А (EGFP-SpA). Вибір їх не є випадковим, а обґрунтований певними факторами. Так, убіквітин є внутрішньоклітинною молекулою що присутня у всіх клітинах еукаріотів і в нормі не може знаходитись за її межами. Протеїн А є поверхневим протеїном і патогенним фактором бактерій виду *Staphylococcus aureus*. Наявність обох цих компонентів у позаклітинному просторі сприяє їхньому поглинанню клітинами імунної системи. А отже їхня наявність у складі часток підвищуватиме імовірність поглинання комплексів імунними клітинами. До того ж завдяки наявності флуоресцентної мітки у складі цих рекомбінантних протеїнів та у складі нашого цільового антигену ми змогли

підтвердити успішне навантаження часток як цільовим, так і ад'ювантними протеїнами.

Позитивні результати функціоналізації часток демонструють можливість використання додаткових молекул для підсилення імунної відповіді. Саме тому нами було проведено визначення можливих ад'ювантних молекул, що могли б підсилити індукцію імунної відповіді до цільового антигену – дифтерійного токсину.

Рецептором для ДТ є гепаринзв'язувальний фактор росту, що подібний до епідермального фактору росту (HB-EGF) [7]. Завдяки взаємодії рецепторзв'язувальної субодиниці ДТ – субодиниці В (SbB) з EGF-подібним доменом proHB-EGF відбувається проникнення в клітину ензиматичноактивної субодиниці ДТ – субодиниці А (SbA), [9]. А тому дослідження цього рецептору та факторів що впливають на його експресію на клітинах є цікавим та перспективним.

Загалом клітини лінії J774, що походили від макрофагів миші та мали низький вихідний рівень експресії proHB-EGF, у більшості випадків відповідали на активуючі стимули збільшенням експресії proHB-EGF, а клітини лінії Raji, що походили від В-клітин людини та мали високий вихідний рівень експресії proHB-EGF, відповідали на активуючі стимули переважно зменшенням експресії proHB-EGF. Функціональні відмінності макрофагів і В-клітин обумовлюють різну відповідь цих клітин на активуючі стимули. Коли макрофаги, що виділяють у вогнищі запалення значну кількість sHB-EGF, отримують сигнали про підвищення їхньої щільності в осередку запалення, наявність інших мітогенних факторів і достатню кількість sHB-EGF у середовищі, вони зменшують злучування sHB-EGF, що призводить до підвищення кількості виявленого proHB-EGF на поверхні клітин. Цей процес ми спостерігали за умов дії ЛПС та rsHB-EGF на клітини лінії J774. В-клітини, які мають на своїй поверхні велику кількість proHB-EGF, завжди готові відповісти на мітогенні стимули інших клітин продукуванням власного sHB-EGF. Цей процес, очевидно, є важливим для

запуску проліферації окремих клонів В-клітин, які розпізнали антиген і провзаємодіяли з Т-хелперами, та забезпечує утворення великої кількості антитілоутворюючих клітин і формування потужної гуморальної імунної відповіді. Саме тому підвищення виділення sHB-EGF у відповідь на такі стимули, як дію ЛПС та rsHB-EGF, призводило до зменшення кількості proHB-EGF на клітинах лінії Raji [127].

Ще одним підходом для покращення ад'ювантних властивостей комплексу є використання рекомбінантних антитіл (одноланцюгових варіабельних фрагментів антитіл scFv) специфічних до рецептора ДТ, що могли б застосовуватись для створення систем ціленаправленої доставки лікарських засобів. Досить часто при експресії у клітинах *E. coli* рівень продукції scFv-антитіл є недостатньо високим, а самі вони можуть синтезуватись у функціонально неактивній формі і накопичуватись у тільцях включень. Одним з підходів для збільшення ефективності експресії кінцевого продукту є коекспресія чи гібридизація із фрагментом D-E-A-A' стафілококового протеїна А [7], що в рамках визначення імовірних ад'ювантних молекул є додатковим бонусом. Адже поєднання двох таких молекул зможе підвищити імовірність захоплення часток клітинами імунної системи.

Було досліджено вплив фрагменту стафілококового протеїну А (SpA) у складі злитого протеїну з scFv-антитілами на ефективність експресії кінцевого продукту. На прикладі scFv-антитіл специфічних до HB-EGF показано, що рівень їхньої експресії у злитій із D-E-A-A' фрагментом SpA формі значно перевищував рівень експресії вільних scFv у аналогічній експресійній системі. При цьому, у складі злитих протеїнів scFv-антитіла зберігали свої антиген-зв'язувальні властивості, а фрагмент протеїна А – здатність зв'язувати інші імуноглобуліни [128].

ВИСНОВКИ

Таким чином, в ході дисертаційної роботи було досліджено здатність рекомбінантного фрагменту дифтерійного токсоїду, іммобілізованого на частках різного розміру та хімічної природи, індукувати антитілоутворення при введенні *per os* та визначено, що кон'югати на основі PLGA-часток продемонстрували найкращі результати за здатністю до взаємодії з антиген-презентувальними клітинами, їхнім цитотоксичним впливом та антигенними властивостями.

1. Синтезовано частки різної хімічної природи на основі золота, фосфату кальцію та полі(D,L-лактид-ко-глюколіду) та розроблено метод отримання їхніх кон'югатів з іммобілізованим рекомбінантним похідним дифтерійного токсину – субодиницею В міченою флуоресцентним протеїном EGFP (EGFP-SubB);
2. Визначено основні характеристики комплексів часток з рекомбінантним фрагментом дифтерійного токсоїду, такі як форма, розмір та параметри навантаження антигеном. Показано, що найменшими за розміром були частки Gold 1, а найбільшими - PLGA 2. (Gold 1 \approx 9нм, Gold 2 \approx 16нм, CaP \approx 35нм, PLGA 1 \approx 35нм, PLGA 2 \approx 100нм). При цьому найбільшу ефективність іммобілізації антигену продемонстрували частки CaP, що сорбували на собі практично 90% доданого протеїну, а от найнижчу ефективність включення антигену продемонстрували частки Gold 1 та Gold 2 (24% та 27% відповідно) ;
3. Досліджено особливості взаємодії отриманих часток різного розміру та хімічної природи з антиген-презентувальними клітинами та встановлено, що клітинами лінії J774 найкраще фагоцитуються частки на основі PLGA обох типів. До того ж, при дослідженні *in vitro*, продемонстрований дозозалежний цитотоксичний вплив часток CaP, Gold 1 та Gold 2 по відношенню до клітин лінії U937 (константи напівмаксимального інгібування для яких становлять 6,93 мг/мл, 1,51 мг/мл та 1,55 мг/мл

- відповідно), та часток Gold 1 та Gold 2 по відношенню до клітин лінії U937 (константи напівмаксимального інгібування для яких становлять 1,97 мг/мл та 0,76 мг/мл відповідно).
4. Досліджено особливості динаміки розвитку гуморальної ланки імунної відповіді у мишей при пероральній імунізації комплексами часток з рекомбінантним фрагментом дифтерійного токсоїду та показано, що частки на основі PLGA 1 та PLGA 2 з іммобілізованим антигеном найкраще стимулюють продукцію специфічних сироваткових антитіл класів G (титр яких вже після першої імунізації виріс у 10 та 12 разів, відповідно, у порівнянні з контрольною групою) та антитіл класу A (титр яких збільшився у 5 та 6 разів, відповідно, після другої імунізації). Встановлено також дозування для найбільш ефективною стимуляції гуморальної імунної відповіді до антигену, що становило 250 мкг на 1 кг маси тіла тварини.
 5. Проведено підбір методик оптимізації конструкції часток на основі PLGA, які могли б підсилити індукцію імунної відповіді до цільового антигену - дифтерійного токсоїду, а саме використання додаткового покриття полімерних часток захисним шаром хітозану, що сповільнює вивільнення цільового антигену, при цьому час виходу 65 % антигену збільшується з 5 діб до 22 діб. Продемонстровано, що полімерні частки вкриті захисною оболонкою у 1,5 разів краще стимулюють продукцію специфічних сироваткових антитіл класів G у порівнянні з частками непокритими хітозаном.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Holmgren J. and Czerkinsky C. Mucosal immunity and vaccines // *Nature Medicine* - 2005. - Vol. 11. - N 4 Suppl. - pp. S45-53.
2. Lycke N. Recent progress in mucosal vaccine development: potential and limitations // *Nature Reviews Immunology* - 2012. - Vol. 12. - N 8. - pp. 592-605.
3. Csaba N., Garcia-Fuentes M. and Alonso M.J. Nanoparticles for nasal vaccination // *Advanced drug delivery reviews* - 2009. - Vol. 61. - N 2. - pp. 140-157.
4. Yuki Y. and Kiyono H. Mucosal vaccines: novel advances in technology and delivery // *Expert review of vaccines* - 2009. - Vol. 8. - N 8. - pp. 1083-1097.
5. Sarti F., Perera G., Hintzen F., et al. *In vivo* evidence of oral vaccination with PLGA nanoparticles containing the immunostimulant monophosphoryl lipid A // *Biomaterials* - 2011. - Vol. 32. - N 16. - pp. 4052-4057.
6. Neutra M.R. and Kozlowski P.A. Mucosal vaccines: the promise and the challenge // *Nature reviews. Immunology* - 2006. - Vol. 6. - N 2. - pp. 148-158.
7. Yun Y., Cho Y.W. and Park K. Nanoparticles for oral delivery: targeted nanoparticles with peptidic ligands for oral protein delivery // *Advanced drug delivery reviews* - 2013. - Vol. 65. - N 6. - pp. 822-832.
8. Chadwick S., Kriegel C. and Amiji M. Nanotechnology solutions for mucosal immunization // *Advanced Drug Delivery Reviews* - 2010. - Vol. 62. - N 4-5. - pp. 394-407.
9. Сківка Л. Імунітет слизових оболонок репродуктивного тракту: "держава в державі" // *Медицинские аспекты здоровья женщины*. - 2013. - N 8. - с.12-18.
10. Kweon M. Recent progress in mucosal immunology and vaccine. // *Development Experimental & Molecular Medicine*. - 2014. - N 46. - e86.
11. Mestecky, J.. *Mucosal Immunology* // Academic Press, San Diego - 2005/ - N3
12. Ярилин А.А. *Иммунология : учебник* - М.: ГЭОТАР-Медиа, 2010. - 752с.

13. Hedegard W. Anatomy & Physiology: Fluids and Transport
14. Mestecky J, Nguyen H, Czerkinsky C, Kiyono H. Oral immunization: an update. // *Curr Opin Gastroenterol* - 2008. - Vol.24.- N6 - P.713-719.
15. Boman HG. Innate immunity and the normal microflora. // *Immunol Rev.* - 2000. - Vol. 173. - pp. 5-16.
16. Schenk M. The mucosal immune system at the gastrointestinal barrier // *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology.* - 2008. - Vol. 22. - No. 3. - pp. 391-409.
17. Kim S. Antigen targeting to M cells for enhancing the efficacy of mucosal vaccines // *Experimental & Molecular Medicine.* - 2014. - Vol.46. - e85
18. Mueller C. Layers of mutualism with commensal bacteria protect us from intestinal inflammation.// *Gut.* - 2006. - Vol. 55. - N 2 - pp. 276-284.
19. Fukushima K. Colonization of microflora in mice: mucosal defense against luminal bacteria.// *Gastroenterol.* - 1999. - Vol. 34. - N 1 - pp.54-60.
20. Wilson CL. Regulation of intestinal alpha-defensin activation by the metalloproteinase matrilysin in innate host defense.// *Science.* - 1999. - Vol. 286. - N 5437. - pp. 113-117.
21. Ayabe T. Secretion of microbicidal alpha-defensins by intestinal Paneth cells in response to bacteria.// *Nat Immunol.* - 2000. - Vol. 1. - N 2 - pp. 113-118.
22. Clevers H. The intestinal crypt, a prototype stem cell compartment.// *Cell.* - 2013. - Vol. 154 - pp. 274-284.
23. Schulz O. Antigen sampling in the small intestine.// *Trends Immunol* - 2013. - Vol. 34. - pp. 155-161.
24. Owen RL. Epithelial cell specialization within human Peyer's patches: an ultrastructural study of intestinal lymphoid follicles.// *Gastroenterology.* - 1974. - Vol. 66. - pp. 189-203.
25. Corr SC. M-cells: origin, morphology and role in mucosal immunity and microbial pathogenesis.// *FEMS Immunol Med Microbiol* - 2008. - Vol. 52. - pp. 2-12.

26. Frey A. Epithelial M cells: gateways for mucosal infection and immunization. // *Cell*. - 1996. - Vol. 86. - pp. 345-348.
27. Pearay L. Vaccination Strategies for Mucosal Immune Responses. // *Clin. Microbiol. Rev.* - 2001. - vol. 14. - N. 2. - pp. 430-445
28. Mabbott NA. Microfold (M) cells: important immunosurveillance posts in the intestinal epithelium. // *Mucosal Immunol.* - 2013. - Vol. 6. - pp. 666-677.
29. Steinman RM. Decisions about dendritic cells: past, present, and future. // *Annu Rev Immunol.* - 2012. - Vol. 30. - pp. 1-22.
30. Coombes JL. Dendritic cells in intestinal immune regulation. // *Nat Rev Immunol.* - 2008. - Vol. 8. - pp. 435-446.
31. Chang SY. Circulatory antigen processing by mucosal dendritic cells controls CD8 T cell activation. // *Immunity.* - 2013. - Vol. 38. - pp. 153-165.
32. Abraham SN. Mast cell-orchestrated immunity to pathogens. // *Nat Rev Immunol.* - 2010. - Vol. 10. - pp. 440-452.
33. Kurashima Y. Sphingosine 1-phosphate-mediated trafficking of pathogenic Th2 and mast cells for the control of food allergy. // *Immunol.* - 2007. - Vol. 179. - pp. 1577-1585.
34. Kurashima Y. Extracellular ATP mediates mast cell-dependent intestinal inflammation through P27 purinoceptors. // *Nat Commun.* - 2012. - Vol. 3. - p. 1034.
35. Cui Z. Induction of antibody response to *Chlamydia trachomatis* in the genital tract by oral immunization. // *Infect. Immun.* - 1991. - Vol. 59. - pp. 1465-1469.
36. Kelsall B. Gut-associated lymphoid tissue: antigen handling and T-lymphocyte responses. In *Mucosal immunology*. // Academic Press, New York, N.Y. - 1999. - Vol. 2. - pp. 293-317.
37. Nataro J. Enteric bacterial vaccines: *Salmonella*, *shigella*, *cholera*, *Escherichia coli*. in *Mucosal immunology*. // Academic Press, New York, N.Y. - 1999. - Vol. 2. - pp. 851-865.

38. Elson C. Mucosal adjuvants. in *Mucosal immunology*. // Academic Press, New York, N.Y. - 1999. - Vol. 2. - pp. 817-838.
39. Belyakov, I. M. What role does the route of immunization play in the generation of protective immunity against mucosal pathogens? // *Immunol.* - 2009. - Vol. 183. - pp. 6883-6892.
40. Blaschitz, C. Th17 cytokines and the gut mucosal barrier. // *J. Clin. Immunol.* - 2010. - Vol. 30. - pp. 196-203.
41. McAleer, J. P. Mechanisms controlling Th17 cytokine expression and host defense. // *J. Leukoc. Biol.* - 2011. - Vol. 90. - pp. 263-270.
42. Mattsson, J. Complement activation and complement receptors on follicular dendritic cells are critical for the function of a targeted adjuvant. // *J. Immunol.* - 2011. - Vol. 187. - pp. 3641-3652.
43. Coutant R. Oral insulin therapy in newly-diagnosed immune mediated (type I) diabetes: preliminary analysis of a randomized double-blind placebo-controlled study. // *Diabetes.* - 1998. - Vol. 47 - p. 97.
44. Quiding, M. Intestinal immune responses in humans. Oral cholera vaccination induces strong intestinal antibody responses, gamma-interferon production, and evokes local immunological memory. // *J. Clin. Invest.* - 1991. - Vol. 88. - pp. 143-148
45. Eriksson, K. Specific-antibody-secreting cells in the rectums and genital tracts of nonhuman primates following vaccination. // *Infect. Immun.* - 1998. - Vol. 66. - pp. 5889-5896
46. Kozłowski, P.A. Comparison of the oral, rectal, and vaginal immunization routes for induction of antibodies in rectal and genital tract secretions of women. // *Infect. Immun.* - 1997. - Vol. 65. - pp. 1387-1394.
47. Jertborn, M. Local and systemic immune responses to rectal administration of recombinant cholera toxin B subunit in humans. // *Infect. Immun.* - 2001. - Vol. 69. - pp. 4125-4128.

48. Johansson, E.L. Comparison of different routes of vaccination for eliciting antibody responses in the human stomach. // *Vaccine*. - 2004. - Vol. 22. - pp. 984-990.
49. Johansson, E.-L.. Nasal and vaginal vaccinations have differential effects on antibody responses in vaginal and cervical secretions in humans. // *Infect. Immun.* - 2011. - Vol. 69. - pp. 7481-7486.
50. Gockel, C.M. Transcutaneous immunization induces mucosal and systemic immunity: a potent method for targeting immunity to the female reproductive tract. // *Mol. Immunol.* - 2000. - Vol. 37. - pp. 537-544.
51. Nardelli-Haeffliger, D. Specific antibody levels at the cervix during the menstrual cycle of women vaccinated with human papillomavirus 16 virus-like particles. // *J. Natl. Cancer Inst.* - 2003. - Vol. 95. - pp. 1128-1137.
52. Czerkinsky C. Mucosal delivery routes for optimal immunization: targeting immunity to the right tissues. // *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* - 2010. - Vol. 354. - pp. 1-18.
53. Devalapally H. Role of nanotechnology in pharmaceutical product development. // *J. Pharm. Sci.* - 2007. - Vol. 96. - N 10. - pp. 2547-2565.
54. Mestecky J. Oral immunization: an update. // *Curr Opin Gastroenterol.* - 2008. - Vol. 24. - pp. 713-719.
55. Neutra MR. Mucosal vaccines: the promise and the challenge. // *Nat Rev Immunol.* - 2006. - Vol. 6. - pp. 148-158.
56. Holmgren J. Mucosal immunity and vaccines. // *Nat Med.* - 2005. - Vol. 11. - pp. 45-53.
57. Hoft DF. Optimizing vaccine development. // *Cell Microbiol.* - 2011. - Vol. 13. - pp. 934-942.
58. Clemens J. New-generation vaccines against cholera. // *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* - 2011. - Vol. 8. - pp. 701-710.
59. Madhi SA. Effect of human rotavirus vaccine on severe diarrhea in African infants. // *J Med.* - 2010. - Vol. 362. - pp. 289-298.

- 60.Greenberg HB. Rotaviruses: from pathogenesis to vaccination. // Gastroenterology. - 2009. - Vol. 136. - pp. 1939-1951.
- 61.Pasetti, M. F. Immunology of gut mucosal vaccines.// Immunol. Rev. - 2011. - Vol. 239. - pp. 125-148.
- 62.Coffman RL. Vaccine adjuvants: putting innate immunity to work. // Immunity. - 2010. - Vol. 33. - pp. 492-503.
63. Petrovsky N. Vaccine adjuvants: current state and future trends / N. Petrovsky, J.C. Aguilar // Immunol Cell Biol. – 2004. – Vol. 82. – P. 488-496.
64. Macrophagic myofasciitis in childhood: a controversial entity / E. Rivas [et al.]. // Pediatr Neurol. – 2005. – Vol. 33. – P. 350-356.
- 65.Kataoka K. Dendritic cell-targeting DNA-based mucosal adjuvants for the development of mucosal vaccines / K. Kataoka, K. Fujihashi // Expert Rev Vaccines. – 2009. – Vol. 8. – P. 1183-1193.
- 66.Chadwick S. Nanotechnology solutions for mucosal immunization. // Advanced Drug Delivery Reviews. - 2010. - Vol. 62. - pp. 394-407
- 67.Webster D.E.. Advances in oral vaccine delivery options: what is on the horizon? // J. Drug Deliv. - 2003. - Vol. 1. - pp. 227-240.
- 68.Pandey R. Chemotherapeutic potential of alginate-chitosan microspheres as anti-tubercular drug carriers. // J.Antimicrob. Chemother. - 2004. - Vol. 53. - pp. 635-640.
- 69.Wu Y. M celltargeted DNA vaccination. // PNAS - 2001. - Vol. 98. - N 16. - pp. 9318-9323.
- 70.Bhavsar M.D. Polymeric nano- and microparticle technologies for oral gene delivery. // Exp. Opin. Drug Deliv. - 2007. - Vol. 4. - pp. 197-213.
- 71.Giri P.K. Is intranasal vaccination a feasible solution for tuberculosis? // Exp. Rev. Vaccines. - 2008. - Vol. 7. - pp. 1341-1356.
- 72.Csaba N. Nanoparticles for nasal vaccination // Advanced drug delivery reviews - 2009. - Vol. 61. - N 2. - pp. 140-157.

73. He Q., Mitchell A.R., Johnson S.L., et al. Calcium phosphate nanoparticle adjuvant // *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* - 2000. - Vol. 7. - N 6. - pp. 899-903.
74. Chadwick S., Kriegel C. and Amiji M. Delivery strategies to enhance mucosal vaccination // *Expert opinion on biological therapy* - 2009. - Vol. 9. - N 4. - pp. 427-440.
75. Primard C., Rochereau N., Luciani E., Genin C., Delair T., Paul S., Verrier B. Traffic of poly(lactic acid) nanoparticulate vaccine vehicle from intestinal mucus to sub-epithelial immune competent cells // *Biomaterials*. 2010; 31(23). P. 6060-8.
76. Kadiyala I., Loo Y., Roy K., Rice J., Leong K.W. Transport of chitosan-DNA nanoparticles in human intestinal M-cell model versus normal intestinal enterocytes // *Eur J Pharm Sci*. 2010; 39(1-3). P. 103-9.
77. Misumi S., Masuyama M., Takamune N., Nakayama D., Mitsumata R., Matsumoto H., Urata N., Takahashi Y., Muneoka A., Sukamoto T., Fukuzaki K., Shoji S. Targeted delivery of immunogen to primate m cells with tetragalloyl lysine dendrimer // *J Immunol*. 2009; 182(10). P. 6061-70.
78. Zhao L., Seth A., Wibowo N., Zhao CX., Mitter N., Yu C., Middelberg AP. Nanoparticle vaccines. // *Vaccine*. 2013, 32(3):327-37
79. Kalkanidis M, Pietersz GA, Xiang SD, Mottram PL, Crimeen-Irwin B, Ardipradja K, et al. Methods for nano-particle based vaccine formulation and evaluation of their immunogenicity. // *Methods*. 2006;40:20–9.
80. Peek LJ, Middaugh CR, Berkland C. Nanotechnology in vaccine delivery. // *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2008;60:915–28.
81. Niikura K, Matsunaga T, Suzuki T, Kobayashi S, Yamaguchi H, Orba Y, et al. Gold nanoparticles as a vaccine platform: influence of size and shape on immunological responses *in vitro* and *in vivo*. // *ACS Nano*. 2013;7:3926–38.
82. Gregory AE, Titball R, Williamson D. Vaccine delivery using nanoparticles. // *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 2013;3:13.

83. Marradi M, Chiodo F, Garcia I, Penades S. Glyconanoparticles as multifunctional and multimodal carbohydrate systems. // *Chemical Society Reviews*. 2013;42:4728–45.
84. Wang C, Zhu W, Wang BZ. Dual-linker gold nanoparticles as adjuvanting carriers for multivalent display of recombinant influenza hemagglutinin trimers and flagellin improve the immunological responses *in vivo* and *in vitro*. // *Int J Nanomedicine*. 2017,12:4747-62, doi: 10.2147/IJN.S137222
85. Yen H.J.; Hsu S.H.; Tsai C.L. Cytotoxicity and Immunological Response of Gold and Silver Nanoparticles of Different Sizes. // *Small* 2009, 5(13), 1553-61
86. Connor E.E., Mwamuka J., Gole A., Murphy C.J., Wyatt M.D. Gold nanoparticles are taken up by human cells but do not cause acute cytotoxicity. // *Small* 2005,1(3):325-7.
87. Pernodet N., Fang X., Sun Y., Bakhtina A., Ramakrishnan A., Sokolov J., Ulman A., Rafailovich M. Adverse effects of citrate/gold nanoparticles on human dermal fibroblasts. // *Small*. 2006,2(6):766-73.
88. Goodman C.M., McCusker C.D., Yilmaz T., Rotello V.M. Toxicity of gold nanoparticles functionalized with cationic and anionic side chains. // *Bioconjug Chem*. 2004,15(4):897-900.
89. Relyveld E.H., Ickovic M.R., Henocq E., Garcelon M. Calcium phosphate adjuvanted allergens. // *Ann. Allergy*. 1985,54(6):521–9.
90. Chiu D., Zhou W., Kitayaporn S., Schwartz D.T., Murali-Krishna K., Kavanagh T.J., Baneyx F. Biom mineralization and size control of stable calcium phosphate core-protein shell nanoparticles: potential for vaccine applications. // *Bioconjug Chem*. 2012,23(3):610-7. doi: 10.1021/bc200654v.
91. He Q., Mitchell A.R., Johnson S.L., Wagner-Bartak C., Morcol T., Bell S.J. Calcium phosphate nanoparticle adjuvant. // *Clin Diagn Lab Immunol*. 2000,7(6):899-903.
92. Joyappa DH, Ashok Kumar C, Banumathi N, Reddy GR, Suryanarayana VV. Calcium phosphate nanoparticle prepared with foot and mouth disease virus

- P1-3CD gene construct protects mice and guinea pigs against the challenge virus. // *Vet Microbiol.* 2009,139(1-2):58–66.
93. He Q, Mitchell A, Morcol T, Bell SJ. Calcium phosphate nanoparticles induce mucosal immunity and protection against herpes simplex virus type 2. // *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* 2002,9:1021–4.
94. Mohan T., Mitra D., Rao D.N.. Nasal delivery of PLG microparticle encapsulated defensin peptides adjuvanted gp41 antigen confers strong and long-lasting immunoprotective response against HIV-1. // *Immunol Res.* 2013,15:415-20.
95. Mohan T., Sharma C., Bhat A.A., Rao D.N. Modulation of HIV peptide antigen specific cellular immune response by synthetic α - and β -defensin peptides. // *Vaccine.* 2013,31(13):1707-16.
96. Manocha M., Pal P.C., Chitralekha K.T., Thomas B.E., Tripathi V., Gupta S.D., Paranjape R., Kulkarni S., Rao D.N. Enhanced mucosal and systemic immune response with intranasal immunization of mice with HIV peptides entrapped in PLG microparticles in combination with *Ulex Europaeus*-I lectin as M cell target. // *Vaccine.* 2005, 23(48-49):5599-617.
97. Malyala P., Singh V. Microparticle adjuvants: preparation and formulation with antigens. // *Meth Mol Biol.* 2010:91-101.
98. Oyewumi M., Kumar A., Cui Z. Nano-microparticles as immune adjuvants: correlating particle sizes and the resultant immune. // *Expert Rev Vaccines.* 2010,9(9):1095-107.
99. Esparza I., Kissel T. Parameters affecting the immunogenicity of microencapsulated tetanus toxoid // *Vaccine.* 1992,10(10):714-20.
100. Wen Z.-S., Xu Y.-L., Zou X.-T., et al. Chitosan nanoparticles act as an adjuvant to promote both Th1 and Th2 immune responses induced by ovalbumin in mice // *Marine drugs* - 2011. - Vol. 9. - N 6. - pp. 1038-1055.
101. Moran HBT, Turley JL, Andersson M, Lavelle EC. Immunomodulatory properties of chitosan polymers. // *Biomaterials.* 2018 Aug 30;184:1-9. doi: 10.1016/j.biomaterials.2018.08.054.

102. Aranaz I, Mengibar M, Harris R, et al. Functional Characterization of Chitin and Chitosan. // *Current Chemical Biology*. 2009,3(2):203-230. DOI: 10.2174/187231309788166415
103. Kumirska J, Mirko X. W, Thöming J, Stepnowski P. Biomedical Activity of Chitin/Chitosan Based Materials—Influence of Physicochemical Properties Apart from Molecular Weight and Degree of N-Acetylation. // *Polymers (Basel)*. 2011;3:1875-1901. DOI: 10.3390/polym3041875
104. Van der Lubben I.M., Verhoef J.C., Borchard G., et al. Chitosan for mucosal vaccination // *Advanced drug delivery reviews* 2001. 52(2): 139-144.
105. Van der Lubben I.M., Kersten G., Fretz M.M., Beuvery C., Coos Verhoef J., Junginger H.E. Chitosan microparticles for mucosal vaccination against diphtheria: oral and nasal efficacy studies in mice // *Vaccine*. 2003 Mar 28;21(13-14):1400-8.
106. Holmes R. K. Biology and molecular epidemiology of diphtheria toxin and the tox gene / R. K. Holmes // *J Infect Dis*. 2000. 181: 156-167.
107. Олійник О.С. ; Колибо Д.В. ; Кабернюк А.А. ; Лабинцев А.Ю. ; Короткевич Н.В. ; Романюк С.І. ; Комісаренко С.В. Клонування та експресія функціонально активного фрагмента D-E-A-A' протеїну A *Staphylococcus aureus*. // *Біотехнологія*. 2009, 2(1):59-68
108. Labyntsev A.J., Korotkevych N.V., Manoilov K.J., et al. Recombinant fluorescent models for studying the diphtheria toxin // *Russ. J. Bioorganic Chem*. 2014. 40(4):401-9. DOI: 10.1134/S106816201206012X
109. Labyntsev A.I., Korotkevich N.V., Kaberniuk A.A., Romaniuk S.I., Kolybo D.V., Komisarenko S.V. [Interaction of diphtheria toxin B subunit with sensitive and insensitive mammalian cells] // *Ukr Biokhim Zh* (1999). 2010 Nov-Dec;82(6):65-75.
110. Schägger H., and von Jagow G. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa // *Anal. Biochem*. 1987, 166(2): 368-79.

111. Frens G. Controlled Nucleation for the Regulation of the Particle Size in Monodisperse Gold Suspensions // *Nature physical science* 1973, 241: 20–22. DOI:10.1038/physci241020a0
112. Лабинцев А.Ю., Олійник О.С., Кабернюк А.А., et al. Оптимізація умов синтезу кон'югатів протеїну А з колоїдним золотом та розробка підходів для їх характеристики // *Біотехнологія*. 2009, 2(2): 76–83.
113. Gupta R.K., Rost B.E., Relyveld E., Siber G.R. Adjuvant properties of aluminum and calcium compounds. // *Pharm Biotechnol.* 1995;6:229-48.
114. Diwan M., Elamanchili P., Cao M., Samuel J. Dose sparing of CpG oligodeoxynucleotide vaccine adjuvants by nanoparticle delivery // *Curr Drug Deliv.* 2004 Oct;1(4):405-12.
115. Malyala P. and Singh M. Micro/nanoparticle adjuvants: preparation and formulation with antigens // *Methods Mol Biol.* 2010;626:91-101. doi: 10.1007/978-1-60761-585-9_7.
116. Malyala P., Chesko J., Ugozzoli M., Goodsell A., Zhou F., Vajdy M., O'Hagan D.T., Singh M. The potency of the adjuvant, CpG oligos, is enhanced by encapsulation in PLG microparticles // *J Pharm Sci.* 2008 Mar;97(3):1155-64. DOI: 10.1002/jps.21065
117. Tariq M, Alam MA, Singh AT, Iqbal Z, Panda AK, Talegaonkar S, Biodegradable polymeric nanoparticles for oral delivery of epirubicin:*In vitro*, *ex vivo*, and *in vivo* investigations. // *Colloids Surf B Biointerfaces.*, 2015, 128, 448–456. doi: 10.1016/j.colsurfb.2015.02.043
118. Pandit J., Sultana Y., Aqil M.. Chitosan-coated PLGA nanoparticles of bevacizumab as novel drug delivery to target retina: optimization, characterization, and *in vitro* toxicity evaluation. // *Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology.* 2016,45(7):1397-1407. doi: 10.1080/21691401.2016.1243545.
119. Van de Loosdrecht A.A., Beelen R.H.J., Ossenkoppele G.J., Broekhoven M.G., Langenhuijsen M.M. A tetrazolium-based colorimetric MTT assay to quantitate human monocyte mediated cytotoxicity against leukemic cells from

- cell lines and patients with acute myeloid leukemia // *J Immunol Methods*. 1994 Sep 14;174(1-2):311-20.
120. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays // *Journal of Immunological Methods*. 1983, 65: 55-63.
121. Ferrari M., Fornasiero M. Ch., Isetta A. M. MTT colorimetric assay for testing macrophage cytotoxic activity *in vitro* // *Journal of Immunological Methods*. 1990, 13: 165-172.
122. Brumatti G., Sheridan C. and Martin S.J. Expression and purification of recombinant annexin V for the detection of membrane alterations on apoptotic cells // *Methods*. 2008 Mar;44(3):235-40. doi: 10.1016/j.ymeth.2007.11.010.
123. Martin T.L., Mufson E.J. and Mesulam M.M. The light side of horseradish peroxidase histochemistry // *J Histochem Cytochem*. 1984 Jul;32(7):793. DOI: 10.1177/32.7.6736628
124. Chudina T.O., Labyntsev A.Y., Kolybo D.V., Komisarenko S.V. Adjuvant properties of nanoparticles of different chemical structure immobilized with recombinant diphtheria toxoid. *Biotech. Acta*. 2017, 10(4): 14-24. doi.org/10.15407/biotech10.04.014
125. Chudina T.O., Labyntsev A.Y., Manoilov K.Y., Kolybo D.V., Komisarenko S.V. Cellobiose-coated poly(lactide-co-glycolide) particles loaded with diphtheria toxoid for per os immunization. // *Croat Med J*. 2015, 56(2): 85-93. doi: 10.3325/cmj.2015.56.85
126. Chudina T.O., Skoryk M.A. Synthesis and characterization of diphtheria toxoid loaded Poly(D,L-lactic-co-glycolic)acid microparticles. // *Biotech. Acta*. 2018, 11(2): 35-41. doi.org/10.15407/biotech11.02.02
127. Chudina T.O., Labyntsev A.Y., Romaniuk S.I., Kolybo D.V., Komisarenko S.V. Changes of proHB-EGF expression after functional activation of the immune system cells. // *Ukr. Biochem. J*. 2017, 89(6): 33-40. doi.org/10.15407/ubj89.06.031

128. Chudina T.O., Galkin O.V., Siromolot A.A., Oliynyk O.S. Increasing the efficiency of the expression of recombinant scFv-antibodies. // *Biotech. Acta.* 2017, 10(5): 19-29. doi.org/10.15407/biotech10.05.019