

Міністерство освіти і науки України  
Київський національний університет імені Тараса Шевченка

**КУКЛІНА ТЕТЯНА ОЛЕКСАНДРІВНА**

УДК 612.017.12:615.375: 616-097:57.021

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

03.00.09 – імунологія

**АВТОРЕФЕРАТ**  
дисертації на здобуття наукового ступеня  
кандидата біологічних наук

Київ – 2019

Дисертацією є рукопис

Робота виконана на кафедрі мікробіології та імунології Навчально-наукового центру «Інститут біології та медицини» Київського національного університету імені Тараса Шевченка МОН України та у лабораторії імунобіології відділу молекулярної імунології Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України

**Науковий керівник:** доктор біологічних наук, професор  
**Колибо Денис Володимирович,**  
Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України,  
Завідувач лабораторії імунобіології  
відділу молекулярної імунології

**Офіційні опоненти:** доктор біологічних наук, доцент,  
**Гаврилюк Анна Мирославівна,**  
Львівський національний медичний університет  
імені Данила Галицького МОЗ України,  
доцент кафедри клінічної імунології та алергології

доктор біологічних наук, професор,  
академік НАН України  
**Солдаткін Олексій Петрович,**  
Інститут молекулярної біології і генетики НАН України,  
завідувач лабораторії біомолекулярної електроніки

Захист відбудеться “ 29 ” січня 2019 року о 14:00 годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 26.001.24 Київського національного університету імені Тараса Шевченка за адресою: м. Київ, проспект Академіка Глушкова 2, ННЦ «Інститут біології та медицини», ауд. 434

Поштова адреса: 01601, м. Київ, вул. Володимирська, 64/13, Київський національний університет імені Тараса Шевченка, ННЦ «Інститут біології та медицини», спеціалізована вчена рада Д 26.001.24

З дисертацією можна ознайомитись у Науковій бібліотеці ім. М. Максимовича Київського національного університету імені Тараса Шевченка за адресою: м. Київ, вул. Володимирська, 58

Автореферат розісланий “ 26 “ грудня 2018 року

Вчений секретар  
спеціалізованої вченої ради

Ракша Н.Г.

## ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

**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 [Holmgren J. et al., 2005]. 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) [Lyske N., 2012]. 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 [Csaba N. et al., 2009].

Поглиблення знань щодо особливостей розвитку імунної відповіді у слизових відкриває нові можливості для розробки засобів їх 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 [Yuki Y. et al., 2009]. Перевагою вакцинації через слизові є те, що вона може викликати активацію гуморального та клітинного імунітету, як місцево, так і системно.

Серед різноманіття шляхів вакцинації через слизові оболонки, доставка *per os* є найбільш поширеним методом введення препаратів. Пероральна вакцинація має ряд переваг у порівнянні із традиційними методами вакцинації, заснованими на введенні вакцини у формі ін'єкцій: 1) багато інфекційних та паразитичних агентів проникають в організм через слизову кишкового тракту 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) 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 [Neutra M.R. et al., 2006, Yun Y. et al., 20013]. 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 [Yun Y. et al., 20013]. 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 імуномодуючі та імуностимулюючі ефекти, підсилюючи антигенність.

У ролі носіїв для антигену використовують різноманітні наночастки, створені на основі полімерів, металів, ліпідів, ліпополісахаридів тощо [Csaba N. et al., 2009, Chadwick S. et al., 2010]. Проте ад'ювантні та фізико-хімічні властивості усіх цих носіїв досить різні, і тому їх 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 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 (ДТ), 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 токсоду, 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 задачі 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 їх 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 їх 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:** 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 колоїдного 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 їх 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 фактору 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 → Ig G; Ig G → Ig A.

Було проведено визначення перспективних ад'ювантних молекул для функціоналізації часток на основі PLGA з метою підвищення їх антигенних властивостей для індукції захисної імунної відповіді по відношенню до інфекції, спричиненої *C. diphtheriae*.

**Практичне значення одержаних результатів.** Вивчення та оптимізація ад'ювантних властивостей наночасток має на меті подальше їх 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.

В цьому проекті пропонується шляхом підбору умов синтезу створити композити з модельними антигенами, наприклад, рекомбінантним фрагментом дифтерійного токсиду, для пероральної вакцинації.

Використання наночасток для пероральної вакцинації дасть можливість доставити кон'юговані з ними протеїнові антигени до відповідних органів лімфоїдної системи (Песрових бляшок кишечника) без значного пошкодження в ШКТ. 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.

**Особистий внесок здобувача.** Спільно з науковим керівником д.б.н., професором Д.В. Колибо розроблено концепцію дисертаційної роботи, поставлено мету та завдання дисертаційного дослідження, проведено планування схеми експерименту та розробка методичних підходів до виконання комплексу лабораторних досліджень, обговорення отриманих результатів, формулювання висновків. Автором самостійно проаналізовано 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 їх кон'югацію з протеїновими препаратами; оптимізовано умови сорбції антигену та підібрано методи функціоналізації часток; досліджено ад'ювантні властивості комплексів часток.

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 рекомбінантних scFv-антитіл, 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.

**Апробація результатів дисертації.** Основні результати наукових досліджень доповідались на ряді міжнародних та Всеукраїнських наукових конференціях, конкурсах, зокрема на 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; 3 – у виданнях, що входять до міжнародної бази даних Copernicus), 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 їх обговорення, висновків та списку використаних літературних джерел. Робота викладена на 150 сторінках, ілюстрована 6 таблицями та 35 рисунками. Перелік використаних літературних джерел складається зі 127 найменування, з них кирилицею – 2, латиницею – 125.

## ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

### Матеріали та методи дослідження

В експериментах було використано наступні клітинні лінії еукаріот: 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.С. Кавецького НАН України.

Бактеріальні клітини *Escherichia coli* штамів BL21 (DE3) Rosetta та DH10B (Novagen, США). Плазмідні вектори для експресії протеїнів в прокаріотичній системі експресії *pET-24a(+)* та *pET-28a(+)*.

Всього в експериментальних дослідженнях було використано 162 миші *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 у віварії Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України відповідно до «Стандартних правил по упорядкуванню, устаткуванню та утриманню експериментальних біологічних клінік (віваріїв)».

Експресію рекомбінантних антигенів у всіх випадках проводили в клітинах *E.coli* штаму BL21 Rosetta (DE3) шляхом індукції 1 mM IPTG. 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. Чистоту та концентрацію цільових рекомбінантних протеїнів в отриманих пробах оцінювали за допомогою методу ДСН-ПААГ-електрофорезу (метод розділення білків - електрофорез в поліакриламінному гелі з додецилсульфатом натрія).

Використовуючи різні підходи та методи синтезу, нами було отримано 5 типів часток різної хімічної природи та розміру з іммобілізованим рекомбінантним похідним дифтерійного токсину – субодиницею В міченою флуоресцентним протеїном EGFP (EGFP-SubB), а саме: 2 типи часток колоїдного золота (Gold) використовуючи натрій-цитратний метод, заснований на відновленні цитратом натрію золотохлористоводневої кислоти; частки фосфату кальцію (CaP), метод синтезу яких базується на принципі утворення нерозчинних часток фосфату кальцію при змішуванні розчину солей кальцію та фосфату у присутності цитрату натрію; частки на основі полі(D,L лактид-ко-гліколіду) (PLGA) за двома різними методиками, перша з яких заснована на методі заміщення розчинника, а друга на принципі подвійної емульсифікації з використанням методу випаровування розчинника. Для захисту часток від агресивних умов ШКТ та підсилення адювантних властивостей, синтезовані сполуки PLGA покривали хітозаном.

Ефективність іммобілізації антигену на частках визначали з використанням методу ДСН-ПААГ-електрофорезу 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.

Морфологія і зовнішній вигляд частинок були досліджені за допомогою скануючої електронної мікроскопії (SEM). Визначення розмірів часток також проводили і іншими методами: НС (Dynamic light scattering) - лазерна кореляційна спектроскопія) та NTA (Nanoparticle Tracking Analysis) - аналіз траєкторії часток.

Визначення швидкості вивільнення протеїнів з часток здійснювали за допомогою виміру вмісту протеїну в надосадовій рідині через певну кількість днів після інкубації при 37°C.

Для дослідження цитотоксичного впливу часток проводили визначення життєздатності клітин за допомогою МТТ-тесту. З метою визначення

напівлетальних доз для часток, що продемонстрували цитотоксичний вплив, 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.

Визначення варіантів загибелі клітин ліній L929 та U937 проводили на протоковому цитофлуорометрі Coulter Epics XL (Beckman Coulter) з використанням рекомбінантного протеїну Анексин V міченого флуоресцентною міткою EGFP, що у Ca-залежний спосіб специфічно взаємодіє з фосфатидил серином та етидію бромідом (EtBr), що є флуоресцентним ДНК інтеркалятором.

Аналіз ефективності фагоцитозу отриманих часток клітинами лінії J774 проводили кількома методами: методами протокової цитометрії та конфокальної мікроскопії, що було можливим завдяки наявності флуоресцентної мітки у складі модельного антигену. Методом протокової цитофлуориметрії досліджували ефективності сорбції часток та контрольних бактерій на поверхні клітин, при цьому їх інкубацію проводили протягом 15 хв при 4°C, в той час, як інкубація за температури 37°C дозволяла дослідити ефективність поглинання часток протягом певного періоду часу: інкубували протягом 5 хв., 30 хв., 60 хв. та 120 хв. при 37°C та підвищеній концентрації CO<sub>2</sub> у середовищі з подальшим визначенням інтенсивності флуоресценції клітин. Для аналізу на конфокальному мікроскопі проби після додавання часток та барвника ядер клітин Hoechst 33342 інкубували протягом 60 хв. при 37°C та підвищеній концентрації CO<sub>2</sub>, фіксували та аналізували шляхом визначення інтенсивності флуоресценції клітин.

Для визначення здатності кон'югатів часток з антигеном формувати специфічну імунну відповідь до введеного антигену було проведено імунізацію *per os* експериментальних тварин з використанням 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 з інтервалом в 2 тижні. Через тиждень після кожної імунізації проводився забір проб. У експериментальних тварин було досліджено вміст специфічних до антигену сироваткових антитіл класу G та класу A, рівень яких у пробах, отриманих з імунізованих мишей, визначали методом імуноензимного аналізу (ІЕА).

## Результати дослідження та їх обговорення

**Характеристика фізичних, морфологічних, цитотоксичних та ад'ювантних властивостей часток різного походження з іммобілізованим фрагментом дифтерійного токсоду.** Використовуючи різні підходи та методи синтезу, нами було отримано 5 типів часток різної хімічної природи та розміру з іммобілізованим рекомбінантним фрагментом дифтерійного токсоду виходячи з різних фізико-хімічних властивостей та здатності до біодеградації одержаних комплексів.

На першому етапі досліджень синтезовані частки з іммобілізованим на них антигеном EGFP-SubB аналізували на ефективність його включення (табл. 1), а саме: ефективність іммобілізації (EI) протеїнового антигену (порівняння

концентрації протеїну до іммобілізації, і у зразках, що містили протеїн, який залишився незв'язаним після навантаження (надосадова рідина після центрифугування) та навантаження часток (НЧ) (співвідношення кількості зв'язаного протеїну до кількості синтезованих часток).

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 їх розмірів та форми. Усі синтезовані частки за даними електронної мікроскопії мали симетричну округлу форму, при цьому частки, створені на основі колоїдного золота, мали найменші розміри у порівнянні з частками CaP та PLGA (табл. 1).

Таблиця 1

## Характеристика отриманих часток

Властивості	Вид часток	Gold 1	Gold 2	CaP	PLGA 1	PLGA 2
Середній розмір (нм)		9	16	37	35	100
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 (ЕІ), %		24	27	89	47	37
Навантаження часток (НЧ), %		6,4	8,3	1,5	0,2	0,5

Для використання синтезованих часток в якості ад'ювантів за пероральної імунізації обов'язковим етапом є перевірка їх 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 з використанням клітин ліній L929 та U937 (рис. 1).

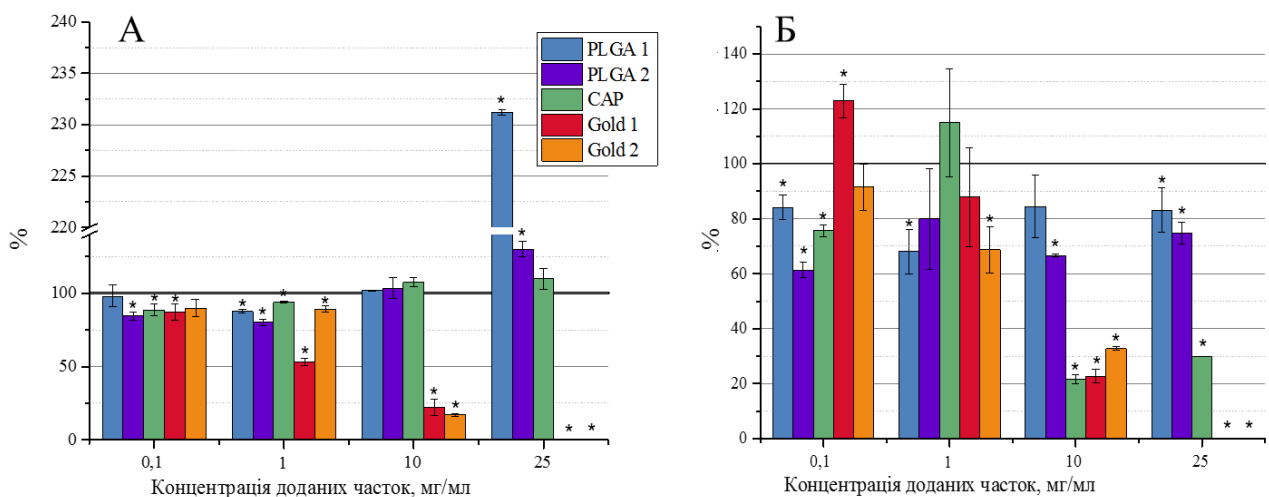


Рис. 1. Життєздатність клітин ліній L929(А) та U937(Б) після інкубації 12 год з частками CaP, PLGA 1, PLGA 2, Gold 1 та Gold 2, доданих в концентраціях 0,1, 1, 10 та 25 мг/мл. (M±SE, n=4).

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

Похідні PLGA не мали вираженого токсичного ефекту на ці клітини. А от вплив часток CaP 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. Наночастки Gold 1 та Gold 2 виявили дозозалежний цитотоксичний вплив в МТТ тесті як для клітин лінії L929, так і для клітин лінії U937.

Для часток з цитотоксичним впливом було проведено дослідження шляхів загибелі клітин ліній L929 та U937 (рис. 2), і 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 їх ефект для L929 виражається переважно у індукції апоптичної загибелі клітин. Для обох типів клітин для золотих наночастинок показана залежність між розміром наночастинок та їх здатністю викликати апоптоз у культурі. Наночастки CaP показали також високу здатність викликати апоптичну загибель клітин лінії U937.

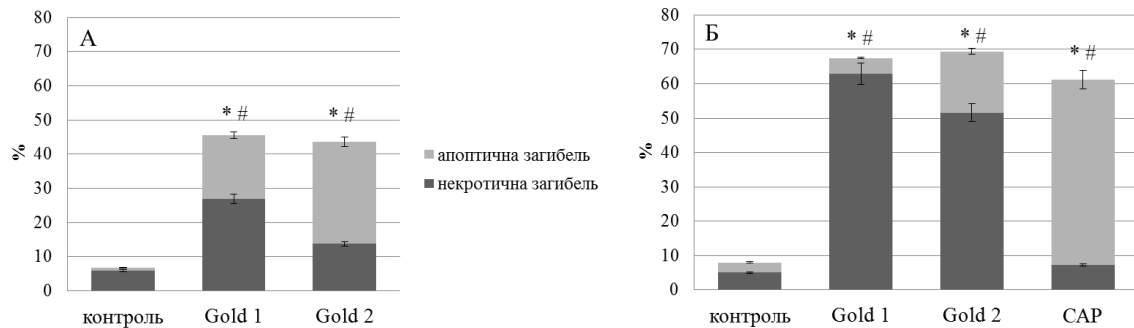


Рис. 2. Загибель клітин ліній L929 (А) та U937 (Б) при дії токсичних доз часток Gold 1 (7 мг/мл), Gold 2 (7 мг/мл) та CaP (27 мг/мл). ( $M \pm SE$ ,  $n=5$ ).

\*  $P \leq 0,05$  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.

Для виявлення закономірностей прояву ад'ювантних властивостей наночастинок як носіїв антигенів було досліджено процеси їх взаємодії з антиген-презентувальними клітинами *in vitro*. Для проведення дослідження було використано макрофагоподібні клітини лінії J774. Для дослідження ефективності сорбції часток та контрольних бактерій на поверхні клітин проводили їх інкубацію 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) видно, що майже усі частки були здатні до сорбції на поверхні клітин, а фагоцитарна активність клітин продемонструвала певну залежність по відношенню до їх сорбційної здатності.

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.

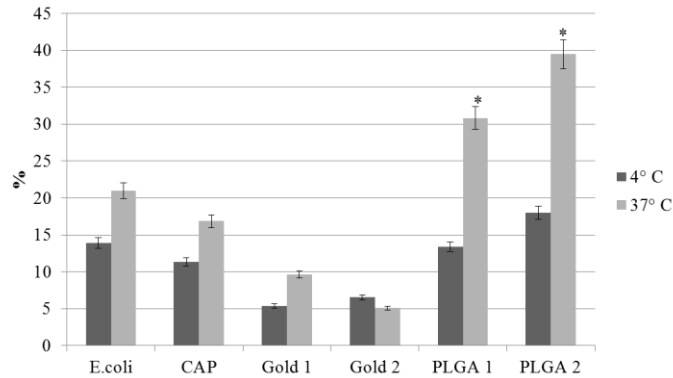


Рис. 3. Взаємодія макрофагальних клітин лінії J774 з частками CaP, Gold 1, Gold 2, PLGA 1 та PLGA 2, а також бактеріями *E. coli* у якості позитивного контролю за температури 4°C та 37°C. (M±SE, n=5).

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

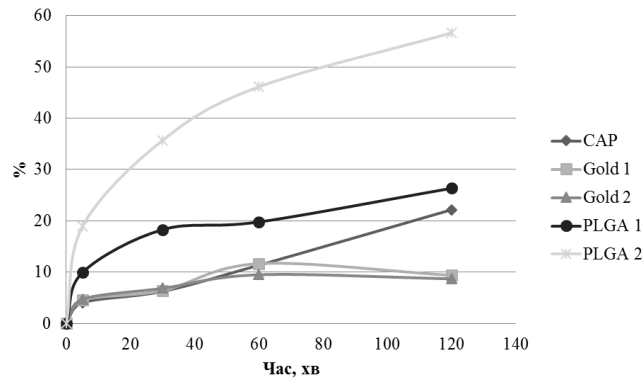


Рис. 4. Динаміка поглинання часток CaP, PLGA 1, PLGA 2, Gold 1 та Gold 2 макрофагальними клітинами лінії J774.

Також було проведено дослідження щодо визначення часових особливостей поглинання часток клітинами лінії J774 методом протокової цитофлуориметрії. Згідно графіку, що відображає динаміку поглинання часток (рис. 4), 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 дані, представлені на рис. 3.

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.

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. 5). Отримані результати співпадають з результатами цитометричного дослідження.

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.

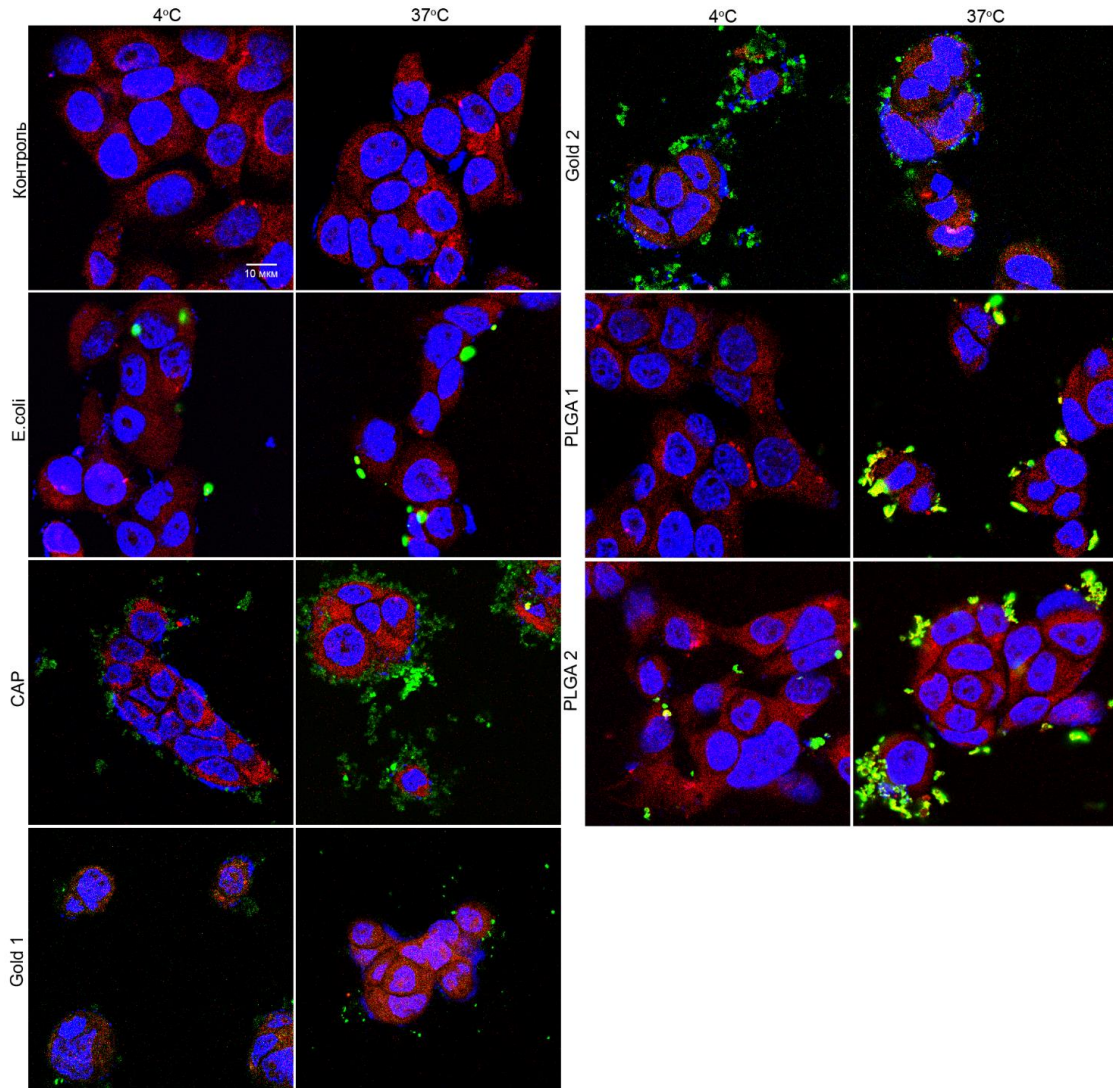


Рис. 5. Взаємодія макрофагальних клітин лінії J774, що інкубувалися з частками CaP, PLGA 1, PLGA 2, Gold 1, Gold 2 або бактеріями *E.coli* у якості позитивного контролю, за температури 4°C та 37°C: зеленим кольором позначені частки/бактерії, синім – ядра клітин, червоним – автофлуоресценція клітин у каналі LP 560 нм.

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). В якості контролю 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 у тварин, імунізованих частками PLGA 1, PLGA 2 та Gold 2, кон'югованими з EGFP-SubB, що надалі зберігався лише у тварин, імунізованих частками PLGA<sub>EGFP-SubB</sub> 1 (рис. 6, А).

Після першої імунізації рівні IgA, специфічних до SubB, були підвищені у сироватках крові мишей, імунізованих частками CaP<sub>EGFP-SubB</sub>, Gold<sub>EGFP-SubB</sub> 2,

PLGA<sub>EGFP-SubB</sub> 1 та у групи, імунізованої вільним EGFP-SubB, в порівнянні з групами, де імунізація проходила частками, кон'югованими з EGFP. Проте, після другої та третьої імунізації відбулося загальне зменшення рівня антитіл класу А. Підвищений рівень IgA у порівнянні з контролем зберігався у груп, імунізованих PLGA<sub>EGFP-SubB</sub> 1 та PLGA<sub>EGFP-SubB</sub> 2.

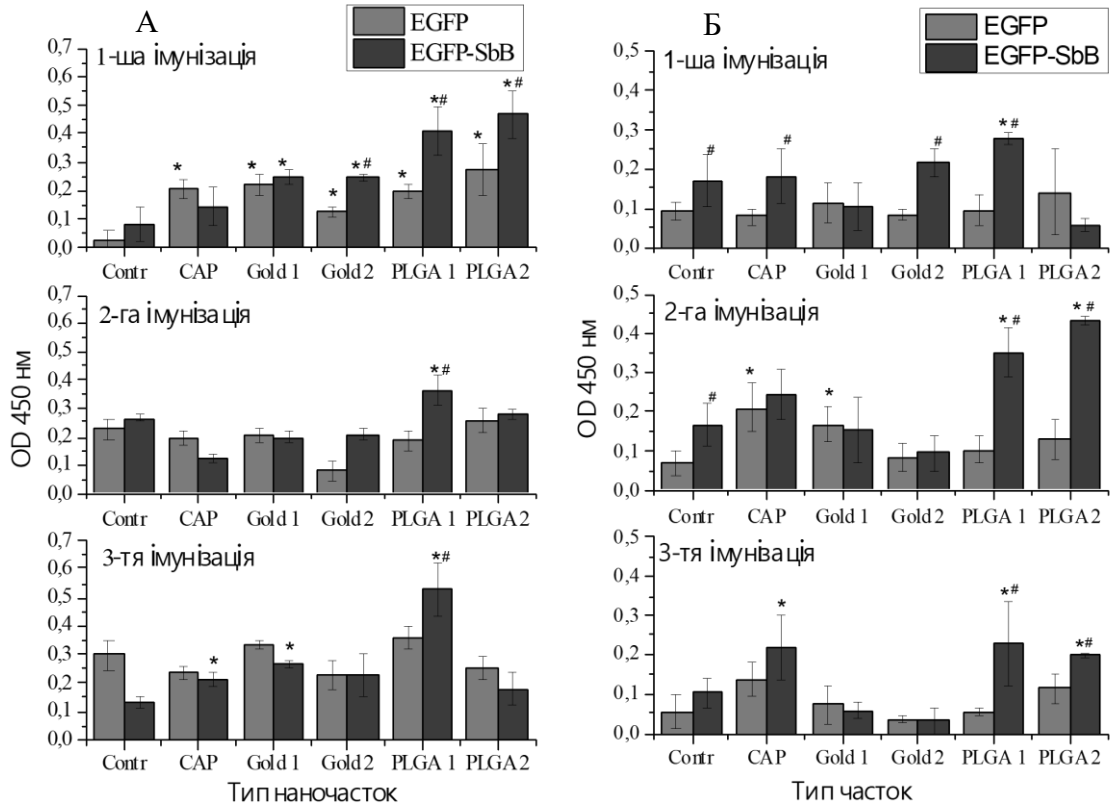


Рис. 6. Рівень антитіл класу G (А) та класу А (Б) до субодиноці В ДТ в сироватці крові мишей, імунізованих частками з іммобілізованим антигеном – EGFP-SubB або контрольним антигеном – EGFP. ( $M \pm SE$ ,  $n=4-6$ ).

\*  $P \leq 0,05$  у порівнянні з контрольною групою імунізованою антигеном EGFP-SubB, #  $P \leq 0,05$  у порівнянні з контрольною групою, імунізованою наночастками з іммобілізованим антигеном – EGFP.

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 А та G до іммобілізованого антигену.

**Характеристика часток на основі полі(D,L-лактид-ко-гліколіду) з іммобілізованим фрагментом дифтерійного токсоїду.** 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 розчинів PLGA з подальшим

використанням методу випаровування розчинника таким чином, щоб антиген інкапсулювався всередині часток. У зв'язку зі внесеними змінами до процесу синтезу часток та їх навантаження антигеном, надалі вони представляються як PLGA 1\* та PLGA 2\*.

Нами було проведено синтез часток на основі PLGA та їх 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\*). Отримані конюгати були охарактеризовані за такими показниками, як: ефективність іммобілізації антигену та навантаження часток, їх розмір за двома різними методами (NTA та НЧС) та індекс полідисперсності (PDI - polydispersity index) (табл. 2).

Таблиця 2

### Характеристика часток PLGA

Досліджувані параметри	PLGA 1*	PLGA 2*
Ефективність іммобілізації, EI (%)	72,1	90,0
Навантаження часток, НЧ (%)	6,6	8,2
Розмір часток за NTA (нм)	183,8	192,8
Розмір часток за НЧС (нм)	203,3	211,6
PDI	0,2	0,1

Оптимізація сорбції антигену на частки полягала у зміні співвідношень антигену та PLGA, а також реакційного об'єму. 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).

Результати електронної мікроскопії часток PLGA підтвердили результати, наведені вище. Як видно зі знімків (рис. 7), поодинокі частки мають округлу правильну форму, їх розміри знаходяться в межах розмірів, визначених за даними NTA та НЧС. 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.

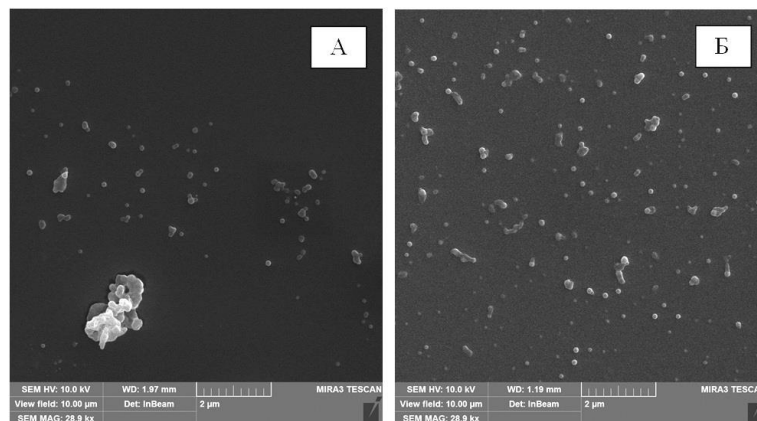


Рис. 7. Електронні мікрофотографії часток, синтезованих на основі полі(D,L-лактидо-ко-гліколіду): А – PLGA 1\*; Б – PLGA 2\*

Надалі була проведена оцінка ефективності прояву антигенних властивостей кон'югованого з частками PLGA антигену в залежності від дози введення та досліджено стан гуморальної ланки імунітету. Тварин було поділено на 2 групи в залежності від типу часток. Групи, в свою чергу, було поділено на 4 підгрупи які отримували різні дози антигену сорбованого на частках.

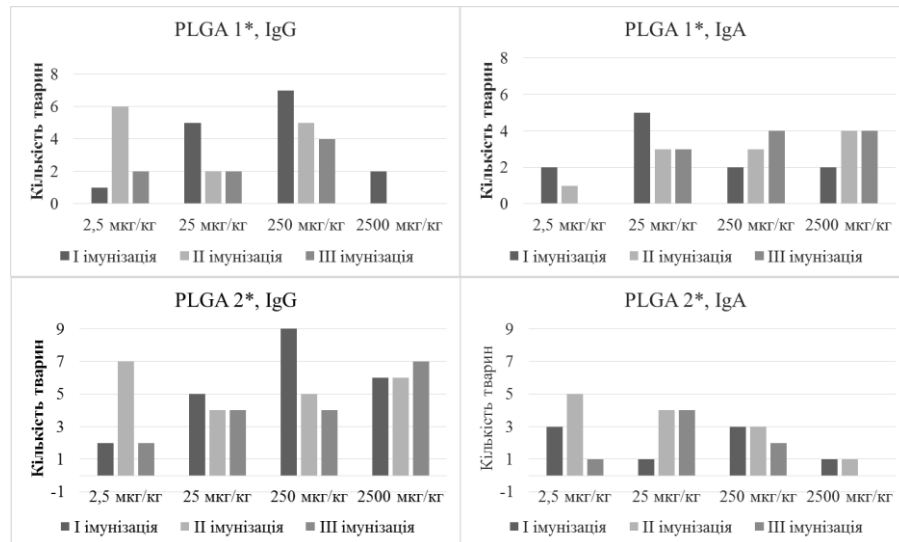


Рис. 8. Кількість тварин з достовірним позитивним рівнем антитіл класу G та A до SubB в сироватці крові мишей, імунованих різними дозами часток PLGA 1\* та PLGA 2\* з іммобілізованим антигеном – EGFP-SubB

Отримані дані вказують, що для стимуляції продукції специфічних проти цільового антигену антитіл класу G з використанням часток PLGA достатньо проводити одну імунацію, оскільки повторення процедури не призводить до збільшення вмісту специфічних IgG (рис. 8). Варто відзначити, що в групі що отримувала антиген у дозуванні 250 мкг/кг усі тварини мали достовірне підвищення рівня специфічних антитіл класу G після першої імунації. Проте їх вміст знижувався з кожною наступною імунацією, що може говорити про толяризацію до введеного антигену.

Вміст IgA у сироватці крові тварин, імунованих частками PLGA підвищувався, і найкращі результати можна відмітити для групи що отримувала частки в дозах 25 мкг/кг та 250 мкг/кг (рис. 8).

**Функціоналізація часток на основі полі(D,L-лактид-ко-гліколіду) з іммобілізованим фрагментом дифтерійного токсоду.** За результатами попередніх досліджень було показано, що частки PLGA 2\* здатні до кращої стимуляції продукції специфічних сироваткових антитіл. У зв'язку з цим подальші дослідження щодо можливості функціоналізації часток іншими ад'ювантними молекулами або їх 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 їх поглинання імунними клітинами.

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.

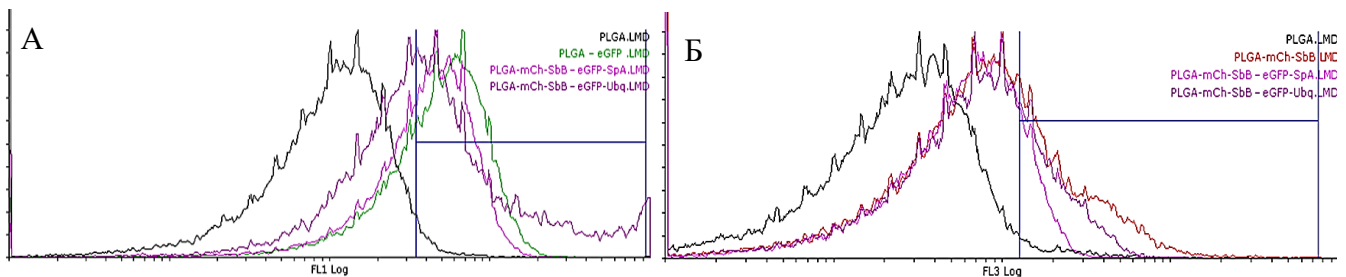


Рис. 9. Розподіл часток PLGA 2\* за навантаженням протеїнів: сорбовані ад'ювантні флуоресцентно мічені протеїни EGFP-SpA, EGFP-Ubq, EGFP (А) та інкапсульований флуоресцентно мічений антиген mCh-SubB (Б).

Синтезовані комплекси були охарактеризовані за навантаження протеїнами шляхом детекції флуоресцентних протеїнів у складі часток методом протокової цитофлуориметрії (рис. 9). Одержані результати дозволяють стверджувати, що частки містили у своєму складі як червону, так і зелену мітки, що свідчить про успішне навантаження як цільовим, так і таргентними білками. А отже нам вдалось отримати комплекси часток з інкапсульованим цільовим білком всередині та з іммобілізованими ад'ювантними білками на поверхні часток.

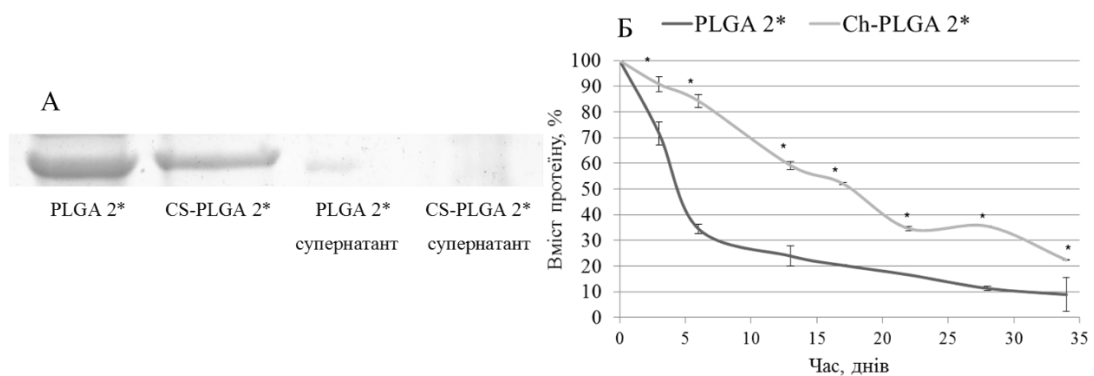


Рис. 10. (А) – електрофореграма, що відображає вміст протеїну EGFP-SubB у складі часток: PLGA 2\* – вміст протеїну після синтезу часток PLGA, CS-PLGA 2\* – вміст протеїну після покриття часток хітозаном, PLGA 2\* супернатант – протеїн, що не іммобілізувався на частки, CS-PLGA 2\* супернатант – протеїн, що вивільнився з

часток після покриття хітозаном; (Б) - динаміка вивільнення протеїнів з часток PLGA 2\* та часток вкритих хітозаном CS-PLGA 2\*. За 100% прийнято вміст протеїну в частках до експерименту ( $M \pm SE$ ,  $n=4$ ).

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

Для покращення стійкості часток до агресивної дії ШКТ розроблена методика їх покриття хітозаном. Перевірка синтезованих комплексів на вміст антигену у складі часток показала, що додаткові маніпуляції, пов'язані з покриттям їх шаром хітозану не впливають на кількісний вміст антигену та не спричиняють його передчасному вивільненню (рис. 10, А), а навіть навпаки, сповільнюють його, що було визначено при дослідженні впливу наявності захисної оболонки на швидкість вивільнення цільового протеїну (рис. 10, Б).

Були, також, досліджені антитілоstimулюючі властивості комплексів після покриття та функціоналізації та визначено, що частки вкриті хітозаном найкраще стимулювали індукцію антитіл класу G після 3 імунізацій, проте достовідного впливу функціоналізації часток рекомбінантним протеїнами EGFP-Ubq та EGFP-SpA відмічено не було (рис. 11).

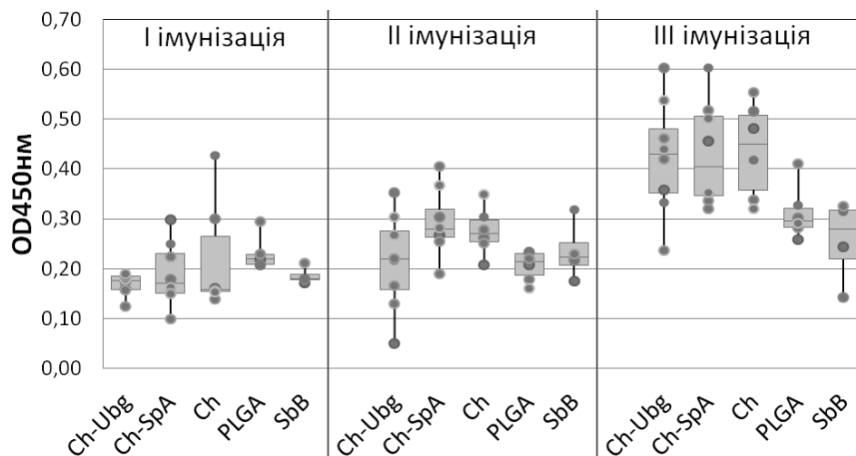


Рис. 11. Рівень антитіл класу G до субодиноці B ДТ в сироватці крові мишей, імунізованих контрольним протеїном EGFP-SubB (SubB), частками PLGA з іммобілізованим антигеном – EGFP-SubB (PLGA), частками PLGA вкритими хітозаном (Ch) та частками PLGA вкритими хітозаном та функціоналізованими протеїнами EGFP-Ubq (Ch-Ubq) або протеїнами EGFP-SpA (Ch-SpA).

## ВИСНОВКИ

Таким чином, в ході дисертаційної роботи було досліджено здатність рекомбінантного фрагменту дифтерійного токсоду, 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 колоїдного золота, фосфату кальцію та полі(D,L-лактид-ко-глюколід) та розроблено метод отримання їх 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 токсину 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 токсину 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 ефективної стимуляції гуморальної імунної відповіді до антигену, що становило 250 мкг на 1кг маси тіла тварини.

5. Проведено підбір методик оптимізації конструкції часток на основі PLGA, які могли б підсилити індукцію імунної відповіді до цільового антигену - дифтерійного токсину, 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 ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

### Статті у наукових фахових виданнях

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., 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)*

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. *(Особистий внесок здобувача: субклонування послідовностей scFv у векторі pET-22b, виділення та очистка рекомбінантних протеїнів, обробка та узагальнення результатів, оформлення рукопису)*

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. *(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)*

### **Тези наукових доповідей**

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. – Wrosclaw, 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.

## 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 за спеціальністю 03.00.09 – імунологія. – Київський національний університет імені Тараса Шевченка МОН України, Київ, 2018.

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

В роботі, зокрема, було досліджено частки різного розміру та хімічної природи синтезованих на основі колоїдного 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 антигенними 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), колоїдне золото, фосфат кальцію.

## АННОТАЦИЯ

**Куклина Т.А. Иммуногенные свойства иммобилизованного на микро- и наночастицах дифтерийного токсоида в условиях пероральной иммунизации. -** Квалификационная научная работа на правах рукописи.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.00.09 - иммунология. - Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко МОН Украины, Киев, 2018.

Диссертационная работа посвящена исследованию и сравнению иммуногенных и имуноадьювантных свойств комплексов частиц различного происхождения синтезированных на основе коллоидного золота (Gold), фосфата кальция (CaP) та поли(D,L лактид-ко-гликолида) (PLGA) с иммобилизованным дифтерийным токсодом при их пероральном введении, и поиску возможных подходов их функционализации для повышения индукции специфического защитного иммунитета к введенному антигену.

В работе были исследованы частицы разного размера и химической природы с иммобилизованным рекомбинантным фрагментом дифтерийного токсоида и определено, что конъюгаты на основе PLGA продемонстрировали лучшие результаты по способности к взаимодействию с антигенпрезентирующими клетками, их цитотоксическим влиянием и иммуногенными свойствами. Проведено подробные характеристики полученных комплексов частиц. Также показано, что функционализация частиц на основе PLGA хитозаном повышает индукцию гуморального звена иммунного ответа к целевому антигену - дифтерийному токсоду. Нами была продемонстрирована эффективность предложенного подхода для пероральной иммунизации дифтерийным токсодом, который, также, может быть взят за основу для создания средств индукции защитного иммунитета слизистых оболочек против других антигенов.

**Ключевые слова:** пероральная вакцинация, слизистые оболочки, адьюванты, гуморальный иммунитет, дифтерийный токсод, наночастицы, поли(D,L-лактид-ко-гликолід), коллоидное золото, фосфат кальция.

## ANNOTATION

**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.