

## ТЕОРЕТИЧНА І ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА МЕДИЦИНА

УДК 615.371:57.083.2

*Т.В. Давидова**ДУ «Інститут мікробіології та імунології ім. І. І. Мечникова НАМН України»,  
м. Харків***ПЕРЕКИСНЕ ОКИСНЕННЯ ЛІПІДІВ І БІЛКІВ ПІСЛЯ ВВЕДЕННЯ  
ЛІПОСОМАЛЬНИХ ВАКЦИН**

На базі ДУ «Інститут мікробіології та імунології ім. І. І. Мечникова» було створено декілька експериментальних протигрипозних ліпосомальних вакцин з додаванням ад'ювантів і модифікацією антигенного складу для обрання найоптимальнішого зразка за безпечністю та імуногенністю. Визначено активність процесів перекисного окиснення ліпідів і білків крові після введення офіційних і експериментальних вакцинних препаратів (вміст карбонільних груп білків, гідроперекисів ліпідів, активність глутатіонпероксидази). У ході дослідження визначено відсутність підвищення рівнів первинних продуктів пероксидації ліпідів – гідроперекисів ліпідів та продуктів окиснення білків – карбонільних білків, а також відсутність ефектів інгібіції протиоксидантних ферментів у сироватці крові щурів, яких імунізували ад'ювантною модифікованою ліпосомальною вакциною із використанням хлорофіліпту та етонію, що дає можливість проведення подальших клініко-фармакологічних досліджень даного зразка.

**Ключові слова:** грип, ліпосомальна вакцина, фосфатидилхолін, перекисне окиснення ліпідів.

**Вступ**

В даний час одним з найголовніших напрямів розвитку медичної науки є вакцинологія. Серед питань, що й досі остаточно не вирішені, слід назвати створення безпечної для всіх груп населення вакцини проти грипу, зокрема для імуноскомпрометованих категорій та хворих на хронічну патологію. Грип щорічно викликає епідемії, а наслідки пандемій, викликаних грипом, важко оцінити [1]. На базі Інституту мікробіології та імунології ім. І.І. Мечникова було створено декілька експериментальних протигрипозних ліпосомальних вакцин з додаванням ад'ювантів і модифікацією антигенного складу для обрання найоптимальнішого зразка за безпечністю та імуногенністю.

**Матеріал і методи**

Визначалась активність процесів перекисного окиснення ліпідів і білків крові після введення офіційних і експериментальних вакцинних препаратів (вміст карбонільних

груп білків, гідроперекисів ліпідів, активність глутатіонпероксидази).

**Об'єкти дослідження**

Об'єктом дослідження були тривалентні офіційні сезонні вакцини для профілактики грипу: «Ваксигрип» (Авентіс Пастер, Франція), «Інфлексал В» (Берна Біотех ЛТД, Швейцарія) та експериментальні ліпосомальні вакцинні препарати під умовними назвами «Ліпос 1.1» – зразок з позитивним зарядом поверхні ліпосом і розщепленим антигенним складом, східним зі спліт-вакциною «Ваксигрип», з додаванням хлорофіліпту та етонію в якості ад'ювантів та «Ліпос 1.2» – ад'ювантна з додатковою модифікацією антигенного складу частковим ацилюванням [2–4].

Дослідження перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ) було проведено на лінійних статевозрілих щурах обох статей масою 160–220 г, що були розподілені на групи за статевою ознакою по 10 особин в кожній в умовах контролю за факторами довкілля. Тварин

© Т.В. Давидова, 2017

утримували при постійній температурі (20–25 °С) та відносній вологості повітря (50–70%). Раціон і якість води були стандартними, доступ до води – необмеженим. Тварини були розміщені у клітках групами. Усі роботи з ними проводились згідно з ОСТ 42 1–88 «Тварини лабораторні. Технологічний процес» з дотриманням основних положень Конвенції Ради Європи про охорону хребетних тварин, що використовуються для експериментальних та інших наукових цілей, від 18.03.86, Директиви ЄС від 24.11.86 р. № 609 і МОЗ України від 01.11.2000 р. № 281.

Вміст карбонільних груп білків визначали з 2,4-динітрофенілгідразином за методом [4]. Забарвлені проби реєстрували на двопробне-невному спектрофотометрі Spesord UV VIS проти контролю (проба без 2,4-динітрофенілгідраzinу) в діапазоні довжин хвиль від 330 до 625 нм. Вимірювали різницю екстинкції при 360 і 550 нм і розраховували вміст карбонільних груп білків, використовуючи коефіцієнт молярної екстинкції  $22 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ . Вміст гідроперекисів ліпідів у периферичній крові визначали за методом [4]. Спектр поглинання забарвленого продукту записували на двопробневному спектрофотометрі Spesord UV VIS, вимірюючи різницю екстинкції при 535 і 520 нм. Вміст гідроперекисів ліпідів виражали в еквівалентних кількостях МДА, використовуючи коефіцієнт молярної екстинкції  $1,56 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ . Активність глутатіонпероксидази (КФ 1.11.1.9) вимірювали у сироватці крові спектрофотометрично при 340 нм за методом [4] у 50 мМ  $\text{K}^+$ ,  $\text{Na}^+$ -фосфатному буфері (рН 7,4), що містив 1 мМ ЕДТА; 0,15 мМ NADPH; 1 Од глутатіонредуктази дріжджів; 0,2% тритону X-100 і 3 мМ азиду Na для інгібування КАТ. Гідроперекис кумолу додавали в концентрації 1,2 мМ, перекис водню – 0,4 мМ. Температура – 37 °С. Активність виражали у нмоль NADPH/хв на мг білка або мл сироватки з урахуванням коефіцієнта молярної екстинкції  $6,22 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ . Отримані дані статистично обробили. Для виявлення значущих розбіжностей показників, що порівнювалися, використовували t-критерій Стьюдента. Розбіжності вважали достовірними за умови рівня значущості  $p < 0,05$ .

**Результати та їх обговорення.** Ліпосоми експериментальних зразків вакцин проти грипу було створено з використанням фосфатидилхоліну, що є субстратом для активації процесів ПОЛ. Ці наночастки, що є структур-

но-функціональними компонентами ліпосомальних вакцин, перетерплюють фізичні та хімічні зміни [5, 6]. Однією з біохімічних подій, що відбуваються з ними, є ПОЛ, що супроводжується появою вільних радикалів у системі та, у кінцевому рахунку, викликає деградацію бішарових фосфоліпідних мембран шляхом порушення їх проникності та лізису [3]. У зв'язку з цим система контролю за безпечністю та ефективністю ліпосомальних препаратів повинна включати визначення вмісту в них продуктів ПОЛ. Саме тому було оцінено стан ПОЛ і білків, а також активність антиоксидантного ферменту при застосуванні зразків новостворених вакцинних препаратів із ліпосомальною складовою та комбінацією модифікацій введенням ад'ювантів і зміною антигенного складу. Підвищення первинних і вторинних продуктів ПОЛ і білків у крові внаслідок введення ліпосомальних препаратів здатне знижувати їх терапевтичну ефективність. Так, підвищення концентрації малонового діальдегіду (МДА) значно зменшує ефективність хіміотерапії ліпосомальними препаратами [7, 8]. Перекисне окиснення є процесом метаболічних взаємодій високореактогенних вільних радикалів з молекулами, що відбуваються в організмі у разі нормального, фізіологічного стану, але іноді ці радикали здатні вступати до альтернативних реакцій. До первинних радикалів належать такі, що утворюються в клітинах ферментативним шляхом, а саме радикали кисню (супероксид і гідроксильний радикал), монооксид азоту, радикали, що утворюються в окиснювально-відновних реакціях (убіхінол). Вторинні радикали утворюються при неферментативних реакціях іонів заліза: гідроксил-радикали та радикали ліпідів. Їх утворення також може відбуватися за дії ультрафіолету та в ході метаболізму деяких препаратів. Також за певних умов можуть виникати порушення системи ферментів, що каталізують утилізацію зазначених вільних радикалів, зокрема зниження активності супероксиддисмутази або ферментних систем, що зв'язують іони заліза у плазмі крові (церулоплазміну, трансферину) та у клітинах (феритину). У такому випадку супероксидні радикали та перекис водню вступають у низку альтернативних реакцій: утворення двовалентного заліза з тривалентного, реакція перекису водню й гіпохлориту з іонами двовалентного заліза. Безпосередніми попередниками гідроксильного радика-

лу, який ініціює ланцюгове окиснення ліпідів, служать іони двовалентного заліза та перекис водню. З цієї причини утворення радикалу гідроксилу і пероксидація ліпідів гальмуються речовинами, що знижують концентрацію однієї з цих двох сполук. До них, зокрема, належить глутатіонпероксидаза, що утилізує перекис водню, запобігаючи розгалуженню ланцюгів окиснення ліпідів у мембранах. Дія глутатіонпероксидази зводиться до відновлення гідроперекисної групи жирної кислоти до спиртової з одночасним окисненням глутатіону до дисульфиду. Ефективність роботи глутатіонпероксидази залежить від концентрації вільного глутатіону, при зниженні якої може зростати концентрація цитотоксичних гідроксильних радикалів. Отже, при дослідженні вмісту гідроперекисів ліпідів, які виступають первинними продуктами пероксидації, було зареєстровано достовірно підвищений їх вміст у сироватці крові імунізованих щурів при застосуванні більшості досліджуваних експериментальних модифікованих ліпосомальних і виробничих вакцин (таблиця). Виключення складала група тварин, яким вводили експериментальну модифіковану вакцину «Ліпос 1.2».

*Вміст продуктів ПОЛ і білків та активність глутатіонпероксидази 3 у сироватці крові щурів при застосуванні експериментальних вакцин із модифікаціями у ліпосомальному носії, ( $M \pm \sigma$ ), ( $n=33$ )*

Продукт	ГПЛ, ммоль МДА/1 мл сироватки	Карбоніли білків, ммоль КБ/ мг білка	GP-3, мкмоль НАDPH/мин·мл
«Ваксигрип»	4,20±0,43*	3,20±0,49*	4,79±0,28
«Інфлексал В»	4,27±0,33**	3,22±0,3*	4,80±0,51
«Ліпос 1.1»	4,3±0,22*	3,2±0,24*	4,77±0,51
«Ліпос 1.2»	3,7±0,15	2,48±0,20	4,82±0,33
Фізіологічний розчин	3,58±0,21	2,41±0,30	4,78±0,36

*Примітка.* \* $p \leq 0,05$ , достовірність відмінності даних від даних інтактної групи. \*\* $p \leq 0,1$ ; тенденція до підвищення значень у порівнянні з інтактною групою.

Значення рівня гідроперекисів ліпідів у даному випадку були на рівні значень у інтактних тварин – (3,7±0,15) ммоль МДА/1 мл сироватки проти (3,58±0,21) ммоль МДА/1 мл сироватки відповідно ( $p \leq 0,05$ ). У разі введення вакцини «Інфлексал» відмічалася тенденція до збільшення цього показника до (4,27±0,33) ммоль МДА/1 мл сироватки, але достовірних відмінностей від даних інтактного контролю зареєстровано не було.

Щодо вмісту карбонілів білків, що є характеристикою перекисного окиснення білків, ініційованого пероксидацією ліпідів, спостерігалася подібна картина, а саме в групі тва-

рин, імунізованих ліпосомальною модифікованою вакциною «Ліпос 1.2», цей показник був на рівні такого в групі, що отримала фізіологічний розчин: (2,48±0,20) ммоль КБ/мг білка проти (2,41±0,30) ммоль КБ/мг білка ( $p \leq 0,05$ ). Введення виробничих вакцин призводило до збільшення вмісту карбонілів білків у сироватці крові імунізованих щурів порівняно з інтактними тваринами.

Важливим показником антиоксидантної здатності організму є стан ферментативної активності глутатіонпероксидази 3 (Gpx3), що демонструє здатність до утилізації перекису водню, обмежуючи розгалуження ланцюгів окиснення ліпідів у мембранах. Загалом при дослідженні ферментативної активності Gpx3 було встановлено, що застосування більшості як виробничих, так і модифікованих вакцин не призводить до змін рівня цього показника у порівнянні зі значеннями його у інтактних тварин. Якщо порівнювати ефекти, що були здійснені на активність глутатіонпероксидази введенням досліджуваних вакцин, стає помітною тенденція до підвищення вказаного ферменту в модифікованій формі ліпосомальної вакцини «Ліпос 1.2» (4,82±0,33) мкмоль

НАDPH/хв·мл у порівнянні з виробничою формою «Інфлексалу» (4,80±0,28) мкмоль НАDPH/хв·мл ( $p \leq 0,1$ ), але не є суттєвими. «Ваксигрип» і «Ліпос 1.1» показали дещо менші значення.

Таким чином, дослідження вмісту первинних продуктів пероксидації ліпідів і білків з оцінкою рівня активності антиоксидантного ферменту дозволяє оцінити безпечність їх застосування та надає більшої інформативності щодо біологічних ефектів, які відбуваються за умови введення модифікованих ліпосомальних протигрипозних вакцин в експерименті.

На основі проведених досліджень відмічено переваги модифікованої ліпосомальної

вакцини «Ліпос 1.2» над іншими препаратами, а також низки офіціальних зразків при оцінці їх біологічної дії на процеси окиснення в організмі.

#### Висновки

Безпечність ліпосомальних вакцин за критерієм ПОЛ з додаванням ад'юванту та змінним антигенним складом була оцінена в експерименті на щурах. Використання позитивно заряджених ліпосом з фосфатидилхоліном і додавання ад'ювантів хлорофіліпту та етонію («Ліпос 1.1» та «Ліпос 1.2») не призвело до достовірного підвищення первинних продуктів ПОЛ ані по відношенню до експериментальних зразків, ані по відношенню до офіціальних препаратів – ліпосомального Інфлексалу та Ваксигрипу.

За умови застосування вакцини «Ліпос 1.2» не відбувалася інгібіція антиоксидантного ферменту глутатіонпероксидази 3. При цьому рівень активності глутатіонпероксидази 3 новоствореного ліпосомального зразка з додаванням ад'ювантів «Ліпос 1.1» також не мав до-

стовірної відмінності від рівня активності цього ферменту при введенні щурам фізіологічного розчину.

Таким чином, відсутність підвищення рівнів первинних продуктів пероксидації ліпідів – гідроперекисів ліпідів і продуктів окиснення білків – карбонілів білків, а також відсутність ефектів інгібіції протиоксидантних ферментів у сироватці крові щурів, яких імунізували ад'ювантною модифікованою ліпосомальною вакциною із використанням хлорофіліпту та етонію, дає можливість для подальших клініко-фармакологічних досліджень даного зразка.

#### Перспективи досліджень

Експериментальні зразки потребують подальшого вивчення, насамперед, більш детального вивчення безпечності, продовження доклінічних і клінічних досліджень. Але результати цього дослідження створюють можливість подальшого розвитку вітчизняної вакцинології та згодом впровадження у виробництво української грипозної вакцини.

#### Список літератури

1. Davydova T.V. Features of the immune response during infections and prospects for the vaccines creation [Electronic resource] // Annals of Mechnikov Institute. 2015. № 4. P. 25–39.
2. Volyansky A.Yu., Pogorila M.S., Romanova E.A. et al. Compared of immunogenesis and protein composition of experimental and official virosomal influenza virus vaccine [Electronic resource] // Annals of Mechnikov Institute. 2014. T. 3. P. 13–18.
3. Boudad H., Ponchel G., Legrand P., Duchene D. Poly (isobutylacrylate) cyclodextrin combined nanoparticles for oral administration of saquinavir // Proc. 3rd World Meeting APV. APGI, Berlin, 2000. 24 p.
4. Levine R.L., Williams J.A., Stadtman E.R., Shacter E. Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins // Methods Enzymol. 1994. V. 233. P. 346–357.
5. Henriksen-Lacey M., Korsholm K.S., Andersen P. et al. Liposomal vaccine delivery systems // Expert Opin. Drug. Deliv. 2011. № 4. P. 505–519.
6. Bachmann M.F., Jennings G.T. Vaccine delivery: a matter of size, geometry, kinetics and molecular patterns // Nat. Rev. Immunol. 2010. V. 10 (11). P. 787–796.
7. Sharp F.A., Ruane D., Claass B. et al. Uptake of particulate vaccine adjuvants by dendritic cells activates the NALP3 inflammasome // Proc. Nat. Acad. Sci USA. 2009. № 3. P. 870–875.
8. Harris J., Sharp F.A., Lavelle E.C. The role of inflammasomes in the immunostimulatory effects of particulate vaccine adjuvants // Eur. J. Immunol. 2010. № 3. P. 34–38.

*Т.В. Давыдова*

#### ПЕРЕКИСНОЕ ОКИСЛЕНИЕ ЛИПИДОВ И БЕЛКОВ ПОСЛЕ ВВЕДЕНИЯ ЛИПОСОМАЛЬНЫХ ВАКЦИН

На базе ГУ «Институт микробиологии и иммунологии им. И. И. Мечникова» было создано несколько экспериментальных противогриппозных липосомальных вакцин с добавлением адъювантов и модификацией антигенного состава для избрания оптимального образца с учетом безопасности и иммуногенности. Определена активность процессов перекисного окисления липидов и белков крови после введения официальных и экспериментальных вакцинных препаратов (содержание карбонильных групп белков, гидроперекисей липидов, активность глутатионпероксидазы). Установлено отсутствие повышения уровней первичных продуктов ПОЛ – гидроперекисей липидов

и продуктов окисления белков – карбониллов белков, а также отсутствие эффектов ингибирования противooksидантных ферментов в сыворотке крови крыс, которых иммунизировали адьювантной модифицированной липосомальной вакциной с использованием хлорофиллипта и этония, что дает возможность проведения дальнейших клинико-фармакологических исследований данного образца.

**Ключевые слова:** *грипп, липосомальная вакцина, фосфатидилхолин, перекисное окисление липидов.*

**T.V. Davydova**

**PEROXIDATION OF LIPIDS AND PROTEINS AFTER THE INTRODUCTION OF LIPOSOMAL VACCINES**

On the base of the State University «Institute of Microbiology and Immunology them. I.I. Mechnikov», several experimental anti-influenza liposomal vaccines were created with the addition of adjuvants and modification of the antigenic composition to select the most optimal sample for safety and immunogenicity. Determination of activity of processes peroxidation of lipids and proteins of blood after introduction of officinal and experimental vaccine preparations (content of carbonyl groups of proteins, lipid hydroperoxides, activity of glutathione peroxidase). In the course of the study, the absence of elevated levels of primary lipid peroxidation products – lipid hydroperoxides and protein oxidation products – carbonyls of proteins, as well as the absence of inhibitory effects of antioxidant enzymes in blood serum of rats, which were immunized with adjuvant modified liposomal vaccine using chlorophyll and etonium, an opportunity for further clinical and pharmacological research of this sample.

**Keywords:** *influenza, liposomal vaccine, phosphatidylcholine, peroxide oxidation of lipids.*

*Надійшла до редакції 01.09.17*