

М. Р. Козак¹, А. В. Олійник¹, Д. Д. Остапів¹, О. С. Заїченко², В. В. Влізло¹
ІНСТИТУТ БІОЛОГІЇ ТВАРИН НААН¹, ЛЬВІВ
ЛЬВІВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ "ЛЬВІВСЬКА ПОЛІТЕХНІКА"²

БІОХІМІЧНІ ТА ФІЗИЧНІ ВЛАСТИВОСТІ ПОЛІМЕРУ, ВИГОТОВЛЕНОГО НА ОСНОВІ АКРИЛОВОЇ КИСЛОТИ

Завдяки своїй хімічній структурі полімер на основі акрилової кислоти потенційно може слугувати носієм білкових і пептидних молекул. За допомогою турбідиметрії встановлено факт комплексоутворення між полімером і овальбуміном. Завдяки електрофоретичному дослідженню в нативних і денатурувальних умовах виявлено, що комплексоутворення між полімером і білком відбувається через виникнення слабких нековалентних зв'язків. Визначено розмір полімерних частинок у водному розчині, що становить (780 ± 10) нм, а величина утвореного комплексу складає, відповідно, (700 ± 10) нм.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: полімер, турбідиметрія, електрофорез білка, овальбумін, комплексоутворення.

ВСТУП. Вакцинація – основа специфічних заходів профілактики багатьох захворювань. Традиційні вакцини виготовляють на основі живих, ослаблених або вбитих патогенів, що є достатньо ефективним методом боротьби з багатьма вірусними інфекціями. Однак їх застосування має ряд обмежень. Зокрема, не всі віруси можна виростити в культурі клітин, виготовлення традиційних вакцин є високовартісним і потенційно небезпечним, не всі вірусні захворювання (наприклад СНІД) можна попередити вакцинацією, також завжди є ризик потрапляння у готову вакцину недостатньо ослабленого чи живого збудника [1]. Тому вдосконалення специфічних профілактичних засобів – актуальне завдання для біології, гуманної та ветеринарної медицини.

Молекулярні підходи сучасної біології дозволяють створити будь-які рекомбінантні протеїнові антигени. Однак такі речовини є низькоімуногенними або зовсім не імуногенними і потребують ад'юванта, щоб забезпечити сильну і тривалу відповідь імунної системи. Протягом останніх 80-ти років багато сполук з ад'ювантними властивостями пройшли експериментальні дослідження, проте лише сполуки алюмінію застосовують при виготовленні вакцин для профілактики вірусних захворювань людини та тварин [6]. При взаємодії цих речовин з розчинним антигеном утворюються преципітати, що забезпечує повільне вивільнення білка з утвореного комплексу і, як наслідок, © М. Р. Козак, А. В. Олійник, Д. Д. Остапів, О. С. Заїченко, В. В. Влізло, 2012.

док, пролонгацію реакції антитіл [2, 7]. Проте сполуки алюмінію є доволі слабкими ад'ювантами [7] і мають достатньо обмежень у застосуванні (поява алергії [10], розвиток хвороби Альцгеймера [4] та ін.). В останні 20 років проводять інтенсивні дослідження з пошуку/створення альтернативних компонентів вакцин, які б не спричиняли цих та інших побічних реакцій. Як носії для антигену часто використовують полімерні наночастинки різного розміру і складу [5, 8]. Всі ці сполуки проходять доклінічні випробування. На стадії клінічних досліджень перебувають такі сполуки, як монофосфорил ліпід А, Mf-59 (олійно-водна емульсія, що містить сквален), віросоми [3, 9].

Тому, зважаючи на появу нових вірусних захворювань і недоліки традиційних вакцин, метою даної роботи був пошук речовин-носіїв протеїнових антигенів для створення вакцин нового типу.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Полімер МГ-4 було синтезовано на кафедрі органічної хімії Львівського національного університету "Львівська політехніка". Він складається з гліцидил метакрилату, акрилової кислоти, триетиленгліколю метакрилату та бутилакрилату (рис. 1).

Взаємодію полімеру з білком овальбуміном вивчали за допомогою нативного електрофорезу в 10 % поліакриламідному гелі та електрофорезу в денатурувальних умовах у 12 % поліакриламідному гелі з 0,1 % додецилсульфатом натрію.

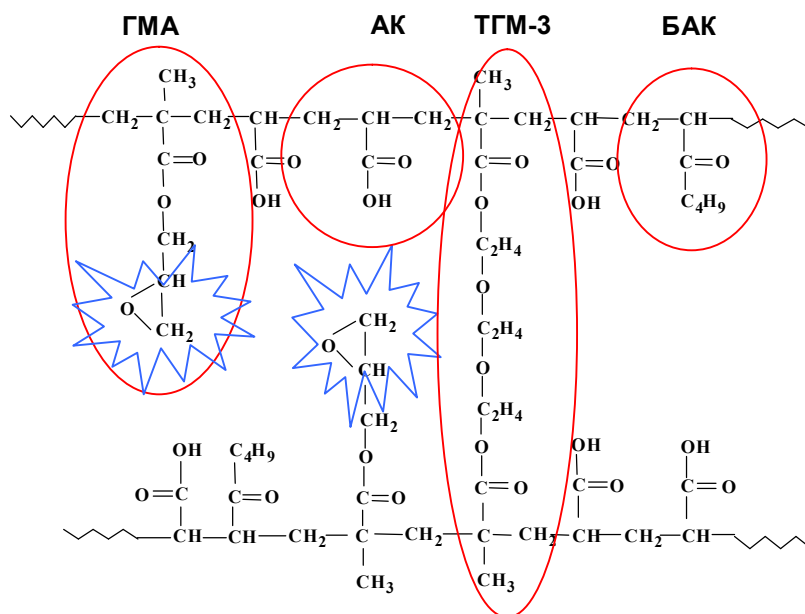


Рис. 1. Структурна формула полімеру МГ-4.
Примітка. ГМА – гліцидил метакрилат, АК – акрилова кислота, ТГМ-3 – триетиленгліколю метакрилат, БАК – бутилакрилат, – епоксидні групи.

Розміри полімеру і комплексу полімеру з овальбуміном визначали завдяки світлорозсіюванню в плоско-паралельній кюветі при довжинах хвиль 420 та 620 нм за допомогою фотоколориметра ЛМФ 72М.

Турбідиметричне титрування. Кількісну характеристику взаємодії полімеру і білка здійснювали з використанням турбідиметра ("TurbiQuant", Німеччина). 0,2 % розчин полімеру титрували 1 % розчином овальбуміну. Суміш вносили в кювету турбідиметра та реєстрували значення мутності, яке виражали у відносних одиницях.

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. Для встановлення фізико-хімічних характеристик взаємодії полімеру МГ-4 з білком було проведено турбідиметричне титрування. Завдяки цьому методу виявлено, що із зростанням вмісту

овальбуміну в розчині мутність його знижується (рис. 2).

Виявлене зниження мутності розчину дозволяє припустити, що розмір комплексу полімер+білок зменшується порівняно з величиною самих полімерних частинок. Це явище, очевидно, є наслідком компартментизації, що властиво багатьом полімерним сполукам, наприклад нуклеїновим кислотам.

За концентрації білка 0,3 мг/мл і вищої спостерігали дуже незначне зниження оптичної густини. Це відбувалося внаслідок того, що всі вільні центри полімеру для зв'язування білка вже зайняті. Таким чином, виявлено оптимальне співвідношення полімеру і білка овальбуміну, що становить, відповідно, близько 1:3. Тобто 1 мг полімеру максимально може зв'язати 3 мг овальбуміну за фізіологічного значення рН.

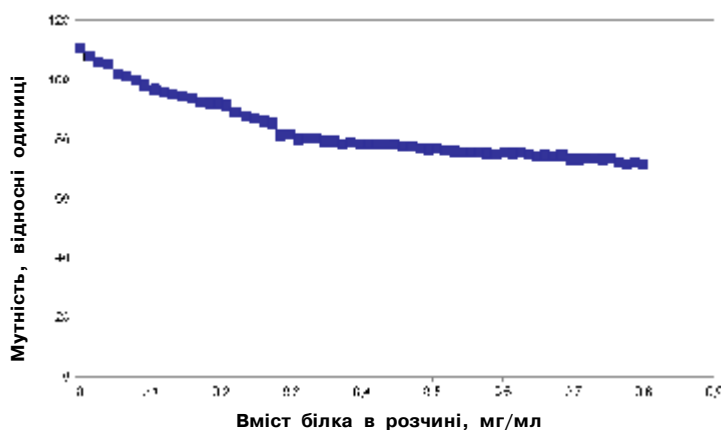


Рис. 2. Турбідиметричне титрування 0,2 % розчину полімеру МГ-4 1 % розчином овальбуміну.

Завдяки світлорозсіюванню у плоско-паралельній кюветі при довжинах хвиль 420 та 620 нм було виміряно розміри частинок полімеру і полімеру з овальбуміном. Величина частинок МГ-4 у водному розчині становила (820 ± 10) нм. При взаємодії полімеру з овальбуміном у рівному співвідношенні розмір сполуки зменшувався до (780 ± 10) нм, а за співвідношення 1:6 становив (700 ± 10) нм. Отримані результати підтверджують припущення про компартментизацію утвореного комплексу полімеру з білком. Це явище схематично зображено на рисунку 3.

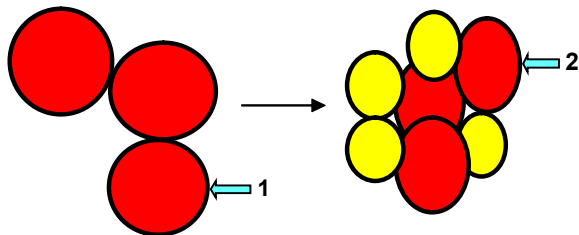


Рис. 3. Схема взаємодії МГ-4 та овальбуміну.

Метою подальшого дослідження було встановити тип взаємодії між білком і полімером. Проведено нативний електрофорез у 10 % поліакриламідному гелі. Для того щоб наблизити експериментальні умови до фізіологічних, частину проб з розчином овальбуміну та полімеру було проінкубовано за 37°C протягом 1 год, а інші відразу вносили у гель. На рисунку 4 видно характерний шлейф білкових зон із молекулярними масами, більшими 40 кДа (доріжки 2 і 3), що підтверджує появу комплексів білка та полімеру з різними молекулярними масами після інкубування за 37°C . За кімнатної температури комплексів не виявлено (рис. 4).

У структурі досліджуваного полімеру МГ-4 міститься дві епоксидні групи (рис. 1), до яких білок може приєднуватися ковалентно. Було проведено електрофоретичне дослідження розчинів полімеру та овальбуміну в денатурувальних умовах з додецилсульфатом натрію. Комплексів полімер+овальбумін виявлено не було (рис. 5). Тому, незважаючи на присутність епоксидних груп у полімері (рис. 1), полімерно-білкові частинки виникають, очевидно, внаслідок слабких зв'язків (водневі, іонні зв'язки та гідрофобні взаємодії).

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Глик Б. Молекулярная биотехнология. Принципы и применение / Б. Глик, Дж. Пастернак ; под ред. Н. К. Янковского ; пер. с англ. – М. : Мир, 2002. – С. 589.
2. Baylor N. W. Aluminum salts in vaccines—US

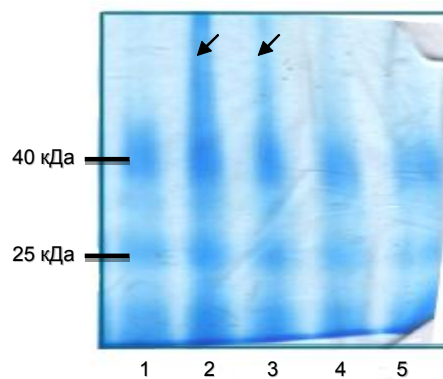


Рис. 4. Дослідження взаємодії овальбуміну з МГ-4 в 10 % поліакриламідному гелі в нативних умовах.

Примітка. 1 – овальбумін; 2 – овальбумін+полімер (співвідношення 1:1) за 37°C ; 3 – овальбумін+полімер (співвідношення 6:1) за 37°C ; 4 – овальбумін+полімер (співвідношення 1:1) за кімнатної температури; 5 – овальбумін+полімер (співвідношення 6:1) за кімнатної температури.

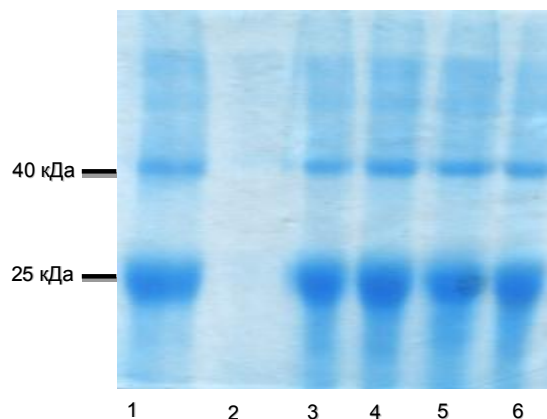


Рис. 5. Дослідження взаємодії овальбуміну з МГ-4 в 10 % поліакриламідному гелі з додаванням 0,1 % додецилсульфату натрію.

Примітка. 1 – овальбумін; 2 – полімер; 3 – овальбумін+полімер (співвідношення 1:1) за 37°C ; 4 – овальбумін+полімер (співвідношення 6:1) за 37°C ; 5 – овальбумін+полімер (співвідношення 1:1) за кімнатної температури; 6 – овальбумін+полімер (співвідношення 6:1) за кімнатної температури.

ВИСНОВКИ. За температури 37°C та фізіологічного значення рН полімер, синтезований на основі акрилової кислоти, проявив білок-зв'язувальну активність. Розмір утворених комплексів становить (700 ± 10) нм. Одержані результати дозволяють припускати, що полімер можна використовувати як носій білків і пептидів, а також як ад'ювант у складі вакцин для посилення імунологічної реакції до антигену.

perspective / N. W. Baylor, W. Egan, P. Richman // Vaccine. – 2002. – **20**, № 3. – P. 18–23.

3. Brunner R. The ABC of clinical and experimental adjuvants – a brief overview / R. Brunner, E. Jensen-

Jarolim, I. Dali-Scholl // Immunol. Lett. – 2010. – **128**, № 1. – P. 29–35.

4. Geographical relation between Alzheimer's disease and aluminium in drinking water / C. N. Martyn, C. Osmond, J. A. Edwardson [et al.] // Lancet. – 1989. – **1**. – P. 59–62.

5. Kanchan V. Interactions of antigen-loaded polylactide particles with macrophages and their correlation with the immune response / V. Kanchan, A. K. Panda // Biomaterials. – 2007. – **28**. – P. 5344–5357.

6. Lindblad E. B. Aluminium adjuvants – in retrospect and prospect / E. B. Lindblad // Vaccine. – 2004. – **22**. – P. 3658–3668.

7. Lindblad E. B. Aluminium compounds for use in

vaccines / E. B. Lindblad // Immunol. Cell Biol. – 2004. – **82**. – P. 497–505.

8. Particle size and surface charge affect particle uptake by human dendritic cells in an in vitro model / C. Foged, B. Brodin, S. Frokjaer, A. Sundblad // Int. J. Pharm. – 2005. – **298**. – P. 315–322.

9. Protection against foot-and-mouth disease by immunization with a chemically synthesized peptide predicted from the viral nucleotide sequence / J. E. Bittle, R. A. Houghten, H. Alexander [et al.] // Nature. – 1982. – **298**. – P. 30–33.

10. T helper 2 biased de novo immune response to keyhole limpet hemocyanin in humans / D. Spazierer, H. Sakhavara, D. Dawid [et al.] // Clin. Exp. Allergy. – 2009. – **39**. – P. 999–1008.

М. Р. Козак¹, А. В. Олийник¹, Д. Д. Остапів¹, А. С. Заиченко², В. В. Влизло¹
ИНСТИТУТ БИОЛОГИИ ЖИВОТНЫХ НААН¹, ЛЬВОВ
ЛЬВОВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ "ЛЬВОВСКАЯ ПОЛИТЕХНИКА"²

БИОХИМИЧЕСКИЕ И ФИЗИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ПОЛИМЕРА, ИЗГОТОВЛЕННОГО НА ОСНОВЕ АКРИЛОВОЙ КИСЛОТЫ

Резюме

Благодаря своей химической структуре полимер на основе акриловой кислоты потенциально может служить носителем белковых и пептидных молекул. С помощью турбидиметрии установлен факт комплексообразования между полимером и овальбумином. Благодаря электрофоретическому исследованию в нативных и денатурирующих условиях обнаружено, что комплексообразование между полимером и белком происходит из-за возникновения слабых нековалентных связей. Определен размер полимерных частиц в водном растворе, что составляет (780±10) нм, а величина образованного комплекса – соответственно (700±10) нм.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: полимер, турбидиметрия, электрофорез белка, овальбумин, комплексообразование.

M. R. Kozak¹, A. V. Oliynyk¹, D. D. Ostapiv¹, O. S. Zaichenko², V. V. Vlizlo¹
INSTITUTE OF ANIMAL BIOLOGY OF NAAS¹, LVIV
LVIV NATIONAL UNIVERSITY "LVIV POLYTECHNIC"²

BIOCHEMICAL AND PHYSICAL PROPERTIES OF POLYMER MADE ON THE BASE OF ACRYLIC ACID

Summary

Due to its chemical structure polymer made on the base of acrylic acid could potentially serve as a carrier of proteins and peptide molecules. Fact of complex appearance between polymer and ovalbumin was established via turbidimetry. Size of polymer particles in an aqueous solution was determined amount to be (780±10) nm, and the value of the formed complex, respectively – (700±10) nm. Electrophoresis study in native and denaturing conditions revealed that the complexation between polymer and protein occurs because of weak noncovalent ligaments.

KEY WORDS: polymer, turbidimetry, electrophoresis of protein, ovalbumin, complex.

Отримано 06.11.12

Адреса для листування: М. Р. Козак, Інститут біології тварин НААН, вул. Стуса, 38, Львів, 79034, Україна, e-mail: mariya_kozak@yahoo.com.