

ГІДРОПЕРЕКИСИ ЛІПІДІВ І ТБК-АКТИВНІ ПРОДУКТИ В ОРГАНАХ МИШЕЙ ЗА ДІЇ АД'ЮВАНТІВ — ПОЛІМЕРА МГ-4 І ГІДРОКСИДУ АЛЮМІНІЮ

А. В. Олійник¹, М. Р. Козак¹, О. С. Заїченко², В. В. Влізло¹

¹Інститут біології тварин НААН

²Національний університет «Львівська Політехніка»

Досліджено вплив ад'ювантів — полімеру МГ-4 та гідроксиду алюмінію на показники пероксидного окиснення ліпідів. Концентрація ТБК-активних продуктів, за впливу полімеру МГ-4 у дозі 1,6 мг/гол, збільшувалась у нирках у 1,7 раза, порівняно із контролем. При дослідженні дії полімеру МГ-4 у концентрації 0,8 мг/гол було встановлено, що рівень ТБК-активних продуктів і гідроперекисів ліпідів у тканинах печінки, селезінки та нирок знаходився у межах норми. Гідроксид алюмінію призводив до зниження вмісту ТБК-активних продуктів у печінці. Вміст гідроперекисів ліпідів у печінці мишей за дії класичного і полімерного ад'ювантів знижувався, а в нирках і селезінці перебував на рівні контрольної групи. Полімер МГ-4 при підшкірному введенні за дози 0,8 мг/гол є безпечним і придатним для подальших імунологічних досліджень з метою створення ефективних вакцин.

Ключові слова: МИШІ, АД'ЮВАНТИ, ПОЛІМЕРИ, ПЕРЕКИСНЕ ОКИСНЕННЯ ЛІПІДІВ, ТБК-АКТИВНІ ПРОДУКТИ, ГІДРОПЕРЕКИСИ ЛІПІДІВ

Однією із основних змін клітинного метаболізму є активація пероксидного окиснення ліпідів (ПОЛ), за якого утворюються гідроперекиси ліпідів, дієнові кон'югати та ТБК-активні продукти. У нормальних умовах їх кількість у тканинах знаходиться на сталому рівні. Вони сприяють усуненню руйнівних компонентів дихального ланцюга в мітохондріях, активують процеси проліферації та диференціації клітин, транспорт іонів, беруть участь у регуляції проникності клітинних мембран, руйнуванні пошкоджених хромосом і т. д. [1]. Проте збільшення продуктів ПОЛ може свідчити про порушення захисної функції організму, а зменшення — детектуються при хронічних захворюваннях. Інтенсифікація процесів ПОЛ призводить до розвитку так званого «окисного стресу», що викликає зміни в активності мембрано-зв'язаних ферментів, порушення функцій багатьох білків, зниження регуляторного впливу гормонів, медіаторів, тощо [2–5]. Визначення вмісту гідроперекисів ліпідів і ТБК-активних продуктів є складовою комплексного дослідження можливої токсичної дії потенційних лікарських речовин, серед яких є і сполуки з ад'ювантними властивостями.

Єдиними ад'ювантами, які сьогодні дозволені для використання в більшості країн, є гідратокису алюмінію і фосфат алюмінію, які вже понад 80 років використовуються для підвищення реакції імунної системи. Експериментальні дослідження показали, що алюміній-вмісні вакцини часто спричиняють серйозні імунологічні порушення. Зокрема, сполуки алюмінію призводять для розвитку автоімунних захворювань, різних неврологічних ускладнень та інших поствакцинальних несприятливих наслідків для здоров'я [6]. Як свідчать дослідження [7], у патогенезі автоімунних захворювань і передчасному старінні шкіри важлива роль належить посиленню процесів ПОЛ.

Метою нашої роботи було вивчити вплив на процеси ПОЛ в органах мишей при застосуванні у вакцинації нанорозмірного полімеру МГ-4 як потенційного ад'юванта і гідроксиду алюмінію — класичного компонента вакцин.

Матеріали і методи

Полімер МГ-4 було синтезовано на кафедрі органічної хімії Національного університету «Львівська політехніка». Він складається із гліцидил метакрилату, акрилової кислоти, триетиленгліколю метакрилату та бутилакрилату. Завдяки наявності епоксидних груп МГ-4 здатний ковалентно зв'язувати білок. Розмір полімеру становить 820 ± 10 нм.

Дослідження проводили на білих нелінійних мишах 5-місячного віку. Лабораторних тварин було поділено на 4 групи (1 контрольна та 3 дослідні). Мишам першої дослідної групи підшкірно вводили 40 мкл суміші МГ-4 (40 мг/мл) та бичачого сироваткового альбуміну (БСА) з концентрацією 100 мг/мл (AppliChem GmbH, Німеччина) у об'ємному співвідношенні (1:1). Тваринам другої дослідної групи вводили підшкірно, в об'ємі 40 мкл, суміш алюміній гідроксиду в концентрації 80 мг/мл та БСА в концентрації 100 мг/мл (AppliChem GmbH, Німеччина) в об'ємному співвідношенні (1:1). Мишам третьої дослідної групи вводили підшкірно 100 мкл МГ-4 у концентрації 15 мг/мл.

Ревакцинацію тварин проводили на 7, 14 та 21 день. На 28 день здійснювали декапітацію мишей, після цього відбирали печінку, селезінку та нирки. Органи гомогенізували в ізотонічному розчині натрію хлориду. У гомогенатах визначали вміст гідро перекисів ліпідів (ГЛ) і ТБК-активних продуктів згідно з методиками [8]. Статистичне опрацювання отриманих результатів проводили із використанням критерію Стюдента за допомогою комп'ютерної програми Microsoft Excel 2007.

Результати й обговорення

У медичній практиці застосовують вакцини лише з такими ад'ювантами — алюміній гідроксидом і алюміній фосфатом [9]. Не зважаючи на високу ефективність у підсиленні імунної відповіді на вакцину, вони мають суттєві недоліки, зокрема сенсibilізацію організму до сполук алюмінію і ризик розвитку аутоімунних і нейродегенеративних захворювань, в т. ч. хвороби Альцгеймера [10]. Тому дуже актуальним є пошук речовин, які б проявляли ад'ювантні властивості та були безпечними. Багато полімерних сполук природного і синтетичного походження, які відповідають цим вимогам [11, 12] зараз проходять доклінічні випробування. Важливе місце серед таких тестувань є вивчення можливого токсичного впливу досліджуваних речовин. У нашій роботі вивчено вплив полімеру МГ-4 та класичного ад'юванта — гідроксиду алюмінію на вміст продуктів ПОЛ в органах білих нелінійних мишей 5-місячного віку.

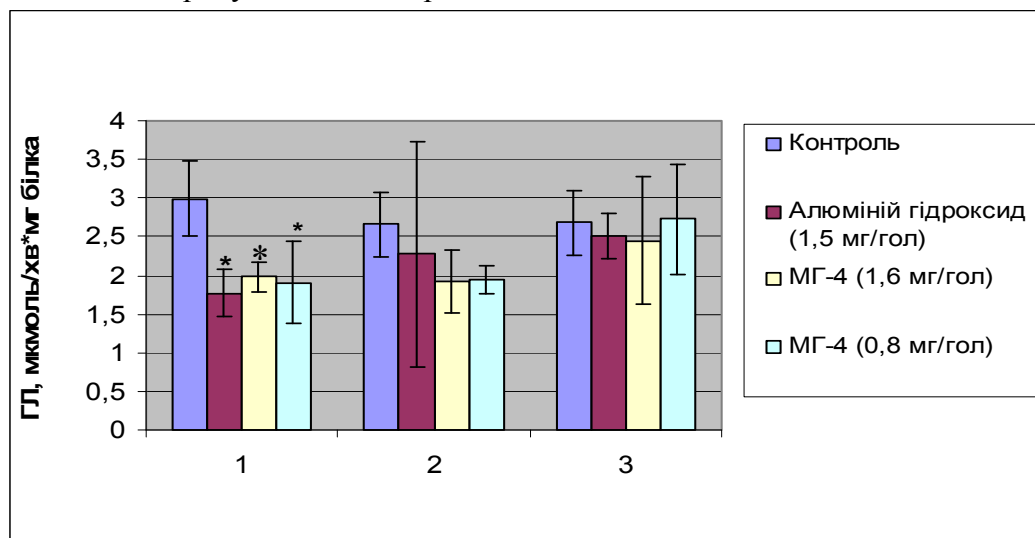


Рис. 1. Концентрація гідроперекисів ліпідів в органах мишей
Примітка: 1 — печінка, 2 — нирки, 3 — селезінка, * — $p < 0,05$

Вміст гідроперекисів ліпідів (ГЛ) характеризувався органо-тканинними особливостями, а полімерний ад'ювант і класичний проявляли однакову дію. Кількість ГЛ у печінці всіх дослідних груп мишей знижувався, порівняно з контрольною групою у середньому на 33 % (рис. 1).

Це вказує на блокування (пряме чи опосередковане) у тканинах цього органу проміжної ланки пероксидних процесів, що веде до утворення гідроперекисів.

У тканинах селезінки та нирок мишей піддослідних груп вміст ГЛ достовірно не відрізнявся від його концентрації у контрольній групі тварин (рис. 1) та знаходився у межах фізіологічних коливань [8]. За дії гідроксиду алюмінію у нирках мишей виявлено значні індивідуальні коливання вмісту ГЛ від 0,81 до 3,74 мкмоль/хв•мг. Ці дані збігаються з

інформацією щодо виявленого негативного впливу цього ад'юванта на організм окремих індивідуумів (хвороба Альцгеймера, аутизм, автоімунні та онкологічні захворювання).

Ще одним показником процесів ПОЛ є концентрація ТБК-активних продуктів. Встановлено, що вміст ТБК-активних продуктів у селезінці усіх груп мишей був однаковим (рис. 2) і знаходився у межах фізіологічних коливань [8]. Відомо, що зниження малонового діальдегіду, який є одним із ТБК-активних продуктів, детектується при хронічних захворюваннях і є проявом ураження клітин [13]. Виявили зменшення на 40 % вмісту ТБК-активних продуктів у печінці тварин, яким вводили гідроксид алюмінію, порівняно з контрольною групою ($p < 0,05$). Однак одержані дані не перевищували межі норми, встановлені для мишей.

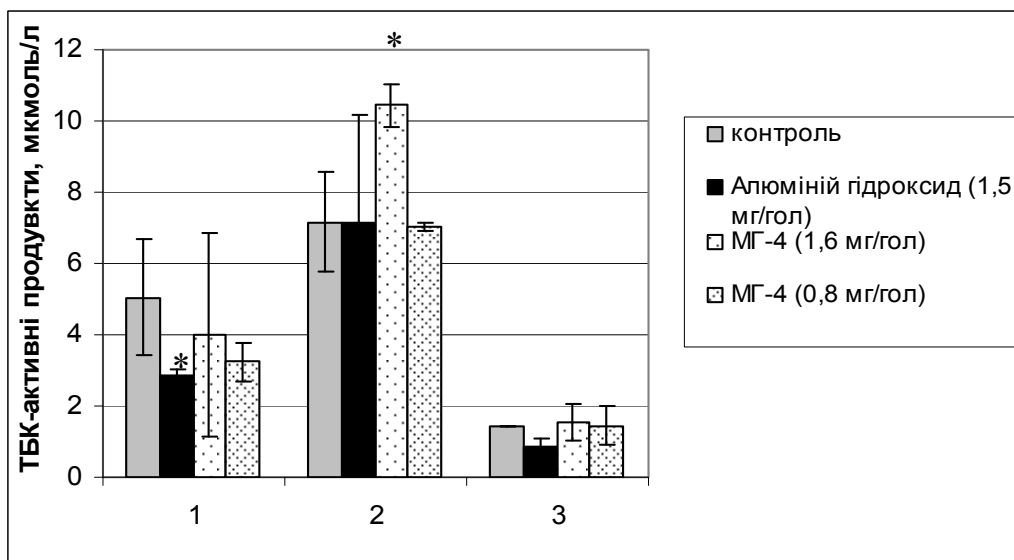


Рис. 2. Вміст ТБК-активних продуктів в органах мишей
Примітка: 1 — печінка, 2 — нирки і 3 — селезінка, $p < 0,05$

Відомо, що посилене утворення ТБК-активних продуктів спостерігається при Е-авітамінозі, пухлинних захворюваннях, у старих тварин, фізичному навантаженні, дії іонізуючої радіації, впливі пестицидів, нітратів, солей свинцю та кадмію, залізодефіцитній анемії, цукровому діабеті, дії синтетичних поверхнево-активних речовин [8]. У нирках мишей, яким підшкірно вводили МГ-4 у дозі 1,6 мг/гол, вміст ТБК-активних продуктів зріс, порівняно з контролем, в 1,7 раза і становив $10,43 \pm 0,59$ мкмоль/л (рис. 2), що перевищує допустиму норму в 1,23 раза. Це може свідчити про певні патологічні зміни, наприклад, інтоксикацію організму.

За введення мишам удвічі нижчої дози полімеру (0,8 мг/гол), при якій він проявляє ад'ювантні властивості, концентрація досліджуваного продукту ПОЛ у нирках знаходилась на рівні контрольної групи ($7,16 \pm 0,098$ мкмоль/л) і відповідала фізіологічним стандартам для мишей (рис. 2).

Вплив гідроксиду алюмінію на рівень ТБК-активних продуктів у нирках проявляв індивідуальний характер. Спостерігалось значне коливання їх концентрації від 4,1 до 10,2 мкмоль/л. Це ще раз підтверджує індивідуальну чутливість різних особин до сполук алюмінію.

Отже, гідроксид алюмінію спричиняє блокування у печінці процесів ПОЛ уже на його первинних ланках, що проявляється у зниженні вмісту ГЛ. Тому і вміст ТБК-активних продуктів, які утворюються на завершальному етапі ПОЛ, у печінці за його дії був зниженим.

Полімерний ад'ювант у дозі 1,6 мг/гол призводив до зростання концентрації ТБК-активних продуктів у нирках, але при цьому вміст ГЛ відповідав контрольній групі. Ці дані вказують на те, що полімер впливає на завершальні процеси ПОЛ. У дозі (1,6 мг/гол), яка вдвічі перевищує дієву, він викликає зміни клітинного метаболізму. При підшкірному введенні полімеру в дозі 0,8 мг/гол впливу на ПОЛ не виявлено.

Висновки

Концентрація ТБК-активних продуктів за впливу полімера МГ-4 у дозі 1,6 мг/гол, збільшувалась у нирках у 1,7 раза, порівняно з контролем. Вміст ТБК-активних продуктів у печінці та селезінці знаходився у межах норми, а за дії полімеру в дозі 0,8 мг/гол і у нирках відповідав фізіологічним показникам.

Гідроксид алюмінію призводив до зниження концентрації гідроперекисів ліпідів і ТБК-активних продуктів у тканинах печінки. Виявлено індивідуальну чутливість мишей до дії гідроксиду алюмінію на перекисне окислення ліпідів у нирках.

Перспективи подальших досліджень. Токсикологічні дослідження дії полімеру МГ-4 на лабораторних тварин з метою виключення потенційних ризиків цієї сполуки для здоров'я і підтвердження можливості її подальшого практичного застосування.

A. V. Oliynyk, M. R. Kozak, O. S. Zaichenko, V. V. Vlizlo

LIPID HYDROPEROXIDES AND TBA-ACTIVE PRODUCTS IN MOUSE ORGANS AT THE ACTION OF ADJUVANTS - POLYMER MG-4 AND ALUMINUM HYDROXIDE

S u m m a r y

The effect of adjuvants: polymer MG-4 and aluminum hydroxide on performance lipid peroxidation is shown. The concentration of TBA-active products, after the influence of polymer MG-4 at a dose of 1,6 mg per mouse, increased in kidney by 1,7 times compared to control. In the study of polymer MG-4 at a concentration of 0,8 mg per mouse on mice found that the level of TBA-active products and lipid hydroperoxides in liver, spleen and kidney was within normal limits. Reducing TBA-active products found in the liver of animals injected with aluminum hydroxide. The content of lipid hydroperoxides in the liver of mice for the actions of classical and polymeric adjuvants decreased, and in the kidney and spleen was at the controls. Polymer MG-4 with subcutaneous administration at doses of 0,8 mg per mouse is permissible and suitable for further immunological studies to establish safe and effective vaccines.

A.V. Олийнык, М.Р. Козак, О. С. Заиченко, В.В. Влизло

ГИДРОПЕРЕКИСИ ЛИПИДОВ И ТБК-АКТИВНЫЕ ПРОДУКТЫ В ОРГАНАХ МЫШЕЙ ЗА ДЕЙСТВИЯ АДЬЮВАНТОВ - ПОЛИМЕРА МГ-4 И ГИДРОКСИДА АЛЮМИНИЯ

А н н о т а ц и я

Исследовано влияние адьювантов — полимера МГ-4 и гидроксида алюминия на показатели перекисного окисления липидов. Концентрация ТБК-активных продуктов, из-за действия полимера МГ-4 в дозе 1,6 мг / гол, увеличивалась в почках в 1,7 раза, по сравнению с контролем. При исследовании влияния на мышей полимера МГ-4 в концентрации 0,8 мг / гол было установлено, что уровень ТБК-активных продуктов и гидропероксидов липидов в печени, селезенке и почках находился в пределах нормы. Снижение ТБК-активных продуктов обнаружено в печени животных, которым вводили гидроксид алюминия. Содержание гидропероксидов липидов в печени мышей при действии классического и полимерного адьювантов снижалось, а в почках и селезенке было на уровне контрольной группы. Полимер МГ-4 при подкожном введении в дозе 0,8 мг / гол является безопасным и пригодным для дальнейших иммунологических исследований с целью создания эффективных вакцин.

1. *Колісник М. І.* Активні форми кисню та їх роль у метаболізмі клітин / М. І. Колісник, Г. В. Колісник, В. В. Нідзюлка, В. В. Влізло // Біологія тварин. — 2009. — Т. 11, № 1–2. — С. 58–69.

2. *Владимиров Ю. А.* Перекисное окисление липидов в биологических мембранах / Ю. А. Владимиров, А. И. Арчаков. — М. : Наука, 1972. — 256 с.

3. *Казимирко В. К.* Свободнорадикальное окисление и антиоксидантная терапия / В. К. Казимирко, В. И. Мальцев, В. Ю. Бутылин и др. — К. : Морион, 2007. — 160 с.
4. *Тимочко М. Ф.* Метаболічні аспекти формування кисневого гомеостазу в екстремальних станах / М. Ф. Тимочко, О. П. Єлісєєва, Л. І. Кобилінська та ін. — Л., 1998. — 140 с.
5. *Ланкин В. З.* Свободнорадикальные процессы при заболеваниях сердечно-сосудистой системы / В. З. Ланкин, А. К. Тихазе, Ю. Н. Беленков // Кардіологія. — 2000. — Т. 40, № 7. — С. 48–57.
6. *Tomljenovic L.* Do aluminum vaccine adjuvants contribute to the rising prevalence of autism? / L. Tomljenovic, C. A. Shaw // Journal of Inorganic Biochemistry. — 2011. — Vol. 105. — P. 1489–1499.
7. *Кутасевич Я. Ф.* Сучасний погляд на псоріатичну хворобу / Я. Ф. Кутасевич, І. О. Олійник // Мистецтво лікування. — 2005. — № 6. — С. 6–11.
8. Лабораторні методи досліджень у біології, тваринництві та ветеринарній медицині / В. В. Влізла, Р. С. Федорук, І. Б. Ратич та ін. ; за ред. В. В. Влізла. — Л. : СПОЛОМ, 2012. — 756 с.
9. *Nakayama T.* Influenza vaccine and adjuvant / T. Nakayama // Yakugaku Zasshi. — 2011. — V. 131, № 12. — P. 1723–31.
10. *Gupta R. K.* Aluminum compounds as vaccine adjuvants / R. K. Gupta // Adv. Drug Deliv. Rev. — 1998. — V. 32, № 3. — P. 155–172.
11. *Salvador A.* Combination of immune stimulating adjuvants with poly (lactide-co-glycolide) microspheres enhances the immune response of vaccines / A. Salvador, M. Igartua, R. M. Hernández, J. L. Pedraz // Vaccine. — 2012. — V. 30, № 3. — P. 589–96.
12. *Rebouças J. S.* Nanoparticulate Adjuvants and Delivery Systems for Allergen Immunotherapy / J. S. Rebouças, I. Esparza, M. Ferrer et al. // J. Biomed. Biotechnol. — Published online 2012 February 26. doi: 10.1155/2012/474605.
13. *Сенаторова Г. С.* Стан внутрішньоклітинних ферментативних систем у дітей з хронічним захворюванням нирок / Г. С. Сенаторова, І. С. Дриль, Н. І. Макєєва, Т. Ф. Колібаєва // Експериментальна і клінічна медицина. — 2010. — № 2. — С. 112–115.

Рецензент: головний науковий співробітник лабораторії живлення та біосинтезу продукції жуйних, доктор сільськогосподарських наук, с. н. с. Вудмаска І. В.