

Изучение структуры и иммуноаdjювантной активности глюкана «АДВА»

Е. А. Генералов

*Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова, физический факультет,
кафедра биофизики. Россия, 119991, Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 2.*

E-mail: generals1179@gmail.com

Статья поступила 14.06.2013, подписана в печать 09.09.2013.

Получены экспериментальные данные, подтверждающие возможность применения полисахаридов в качестве адъювантов. Изучены иммуноаdjювантные свойства полисахарида «АДВА» при совместном использовании с антигенами различной структуры и химической природы — эритроцитами барана, полисахаридным антигеном менингококка, белковым экзотоксином возбудителя столбняка, гемагглютинином вируса гриппа. Охарактеризована структура полисахарида «АДВА» методами ИК-спектроскопии и ГЖХ, показана его нетоксичность. Обсуждается возможность применения «АДВА» в качестве иммуноаdjюванта.

Ключевые слова: иммуноаdjювантная активность, «АДВА», глюкан, углеводы, полисахариды.

УДК: 571.27, 577.29. *PACS:* 87.15.-v, 87.14.-g.

Введение

Адъюванты (АД) — вещества, усиливающие иммунный ответ против совместно вводимых антигенов (АГ). Слово «адъювант» происходит от латинского глагола *adjuvare*, который означает «помогать» или «усиливать» [1]. Разработка эффективных АД для вакцин, обеспечивающих формирование выраженного и длительно сохраняющегося иммунитета на системном уровне или только в месте введения АГ (например, слизистых оболочек), остается одной из сложнейших задач в производстве вакцин. АД применяются в вакцинах для усиления иммунного ответа уже более 80 лет, и на их протяжении соли алюминия были практически единственными адъювантами, одобренными для использования у человека. Адъювантная активность соединений алюминия была впервые продемонстрирована в 1926 г. на примере дифтерийного анатоксина, адсорбированного на гидроксиде алюминия [2], что позволило значительно снизить дозы антигенов при иммунизации и увеличить тем самым безопасность вакцины. С тех пор гидроксид алюминия и фосфат алюминия широко применяются при создании вакцин, используемых для иммунизации людей [3]. Однако сегодня назрела необходимость в разработке нового поколения АД, создаваемых на основе последних достижений в области иммунологии. Соединения для адъюванта должны сочетать в себе способность повышения эффективности вакцин с максимальной переносимостью и безопасностью. При некоторых инфекционных болезнях, таких как, например, малярия, необходимо, чтобы вакцина индуцировала как гуморальный, так и клеточный иммунный ответ. Другая ситуация — это иммунологическое старение. С возрастом, когда иммунная система ослабевает или если она компрометирована, адъювантные вакцины позволяют преодолеть ослабление иммунитета за счет более сильной специфической стимуляции. И, наконец, еще один положительный эффект повышения эффективности вакцин при использовании новых АД — это возможность уменьшения количества АГ на дозу вакцины. Это оказалось трудной задачей для многих соединений. Тем не менее появились вещества на основе углеводов

в качестве перспективных кандидатов для адъювантов. Углеводы являются легкобиоразлагаемыми веществами и поэтому безопасны и хорошо переносятся. Углеводные соединения не депонируются в тканях, поэтому не происходит хронической иммунной активации. Полисахариды играют важную сигнальную роль в функционировании иммунной системы. Из охарактеризованных полисахаридов глюканы достаточно хорошо изучены. Глюканами являются полисахариды, выделенные из растений или микроорганизмов, состоят из повторяющихся D-глюкозных единиц, соединенных гликозидными связями в различных альтернативных конформациях: α -глюкан включают декстран (α -1,6-глюкан), гликоген (α -1,4- и α -1,6-глюкан), пуллулан (α -1,4- и α -1,6-глюкан) и крахмал (α -1,4- и α -1,6-глюкан); β -глюкан включают целлюлозу (β -1,4-глюкан), курдлан (β -1,3-глюкан), ламинарин (β -1,3- и β -1,6-глюкан), *chrysolaminarin* (β -1,3-глюкан), лентинан (очищенный β -1,6 и β -1,3-глюкан из *Edodes Lentinus*), *lichenin* (β -1,3- и β -1,4-глюкан), *pleuran* (β -1,3- и β -1,6-глюкан изолированы от *Pleurotus Ostreatus*) и зимозан (β -1,3-глюкан из *Saccharomyces*). Глюканы повышают как гуморальный, так и клеточный иммунитет и проявляют адъювантную активность, связываясь со специфическими рецепторами, которые экспрессируются на моноцитах и других антиген-презентирующих клетках, что приводит к активации NF- κ B каскада, созреванию моноцитов и продукции провоспалительных цитокинов. Каждый тип глюкана может быть разного качества и чистоты, содержать смеси различных структур полимерной цепи с различными конформационными разветвлениями и длиной полимерной цепи, а также примеси белков клеточной стенки. Структурные различия или наличие загрязняющих веществ в препаратах глюканов могут влиять на их адъювантную активность, что влечет за собой необходимость физико-химической и структурной характеристики. Иммунологически активные углеводсодержащие соединения уникальны по своим физико-химическим и биологическим свойствам, что предоставляет широкий выбор возможностей для дизайна вакцин. В литературе описана адъювантная активность глюканов. Диэтиламино-

этил-декстран (DEAE-декстран) (α -1,6, α -1,3-глюкан), поликатионное производное декстрана, был испытан в качестве ветеринарного адъюванта. DEAE-декстран повышал первичный иммунный ответ макак-резусов к инактивированному формалином вирусу венесуэльского энцефаломиелита лошадей с уменьшением времени синтеза IgG [4]. Также было показано, что зимозан (β -1,3-глюкан) повышал гуморальный и клеточный иммунные ответы на ДНК-вакцинацию у мышей [5]. β -Глюкан, полученный из водорослей экстрагирован из адаптированного штамма *Euglena* (SRI штамм D86-G), выращенных гетеротрофно в темноте, повышал гуморальный и клеточный иммунитет при совместном введении пептидных антигенов [6]. У мышей иммунизация гликобелком D вируса герпеса (gD2) совместно со 100 мкг глюкана водорослей приводила к продукции анти-gD2-антител и значительно повышала популяцию Т-клеток, которые сохранялись дольше, чем у контрольных животных. Ковалентная конъюгация β -глюкана водорослей непосредственно с gD2-антигеном приводила к получению еще более высоких титров антител, что достигается с помощью простой смеси gD2-антигена и β -глюкана [6]. β -глюкан водорослей нетоксичен при внутривенном введении в дозах до 25 мг/кг массы тела.

Целью вакцинации является создание у человека эффективного иммунитета, обеспечивающего длительную защиту от инфекций. Большинство современных вакцин разрабатывается на основе определенных АГ. АГ микроорганизмов, опухолевых клеток или аллергенов вводятся в организм человека в виде очищенных белков. Такие «молекулярные вакцины», как правило, обладают слабой иммуногенностью, и для усиления иммунного ответа со стороны иммунной системы человека к ним необходимо добавлять адъюванты [7, 8].

Настоящая работа посвящена изучению адъювантной активности природного глюкана «АДВА» и некоторых его структурных характеристик.

1. Методы исследования

1.1. Инфракрасная спектроскопия субстанции «АДВА»

ИК-спектры полисахаридов регистрировались на спектрометре с фурье-преобразованием FTIR IRAffinity-1, «Shimadzu» (Япония) методом ATR (ATR-приставка MIRacle (ZnSe/Diamond)), в таблетках KBr, с разрешением 4 см^{-1} . Разложение контура пика в спектре делали с использованием пакета ACDLabs/Spectrus Processor после стандартной процедуры ATR коррекции базовой линии. Спектры регистрировались в диапазоне от 4000 до 400 см^{-1} .

1.2. Спектрофотометрическое определение уроновых кислот в полисахаридах по реакции с 3,5-диметилфенолом и концентрированной серной кислотой

Содержание уроновых кислот в образцах «АДВА» проводили, используя метод разработанный А.И. Усовым [9].

К 0.5 мл гидролизата, приготовленного для ГЖХ, добавляли 0.5 мл 20%-го раствора борной кислоты и затем 4 мл концентрированной серной кислоты. После нагревания при 70°C в течение 40 мин прибавляли

0.1 мл раствора 3,5-диметилфенола. Оптическую плотность измеряли при двух длинах волн — 400 и 450 нм. В качестве стандарта использовали галактуроновою кислоту.

1.3. Определение белка в образцах «АДВА»

К 0.4 мл исследуемого раствора, содержащего 10–100 мкг белка, приливали 2 мл рабочего раствора, перемешивали и оставляли при комнатной температуре на 10 мин. Затем добавляли 0.2 мл реактива Фолина–Чокальтеу, содержимое пробирок тщательно перемешивали и через 30–90 мин колориметрировали при 750 нм. Содержание белка рассчитывали по калибровочному графику [10].

1.4. Анализ моносахаридов

Гидролиз полисахарида проводили 2М-трифторуксусной кислотой с последующим восстановлением моносахаридов до соответствующих ацетатов полиолов, как описано в [11, 12]. Конечные ацетаты полиолов анализировали на хроматографе Hewlett-Packard 5890A (USA) с пламенно-ионизационным детектором, капиллярной колонкой Ultra 2 (Crosslinked 5% Ph Me Silicon $25\text{ м} \times 0.2\text{ мм} \times 0.33\text{ м}$), и интегратором HP 3393 Å в режиме программирования температуры от 175 до 290°C со скоростью $10^\circ\text{C}/\text{мин}$. Исследуемые образцы анализировали параллельно со стандартными образцами, содержащими глюкозу, арабинозу, галактозу или любой другой сахар. В качестве внутреннего стандарта использовали миоинозитол.

1.5. Оценка биологической активности полисахарида «АДВА»

В экспериментах были использованы половозрелые самцы мышей-гибридов (CBAxС57BL6)F₁ из питомника «Столбовая» ГУ НЦ БМТ РАМН.

Иммуноадъювантную активность определяли по влиянию полисахарида «АДВА» на синтез антител к эритроцитам барана, полисахаридному антигену менингококка, белковому экзотоксину возбудителя столбняка и гемагглютинином вируса гриппа.

Для определения титра сывороточных антител (IgG) к эритроцитам барана использовали реакцию прямой гемагглютинации с эритроцитами барана [13]. Исследуемые сыворотки разводили двукратно на забуференном физиологическом растворе, содержащем 0.1% бычьего сывороточного альбумина. Использовали 1%-е формализованные эритроциты барана. Доза антигена на одно животное — $0.6 \cdot 10^7$ эритроцитов. Все реакции ставили в двух повторах.

Для определения титра сывороточных антител к полисахаридному антигену менингококка, белковому экзотоксину возбудителя столбняка, гемагглютинином вируса гриппа использовали стандартные антигенные диагностикумы. Антитела в реакции гемагглютинации определяли с помощью диагностикума эритроцитарного менингококкового полисахаридного (ВГУП «НПО Микроген», МЗ РФ, Москва) и диагностикума эритроцитарного столбнячного антигенного жидкого (ОАО «Биомед» им. И.И. Мечникова, Московская обл.).

Антитела в реакции торможения гемагглютинации определяли с помощью гриппозного диагностикума H_1N_1 и H_3N_2 (ООО по производству диагностических препаратов, С.-Петербург). Эксперименты ставили в трех повторах.

В качестве стандартных антигенов были использованы:

- 1) эритроциты барана;
- 2) полисахаридный антиген — стандартная менингококковая полисахаридная вакцина (производитель — ВГУП «НПО Микроген», МЗ РФ, Москва) [14, 15];
- 3) протеиновый антиген — столбнячный анатоксин в составе АДС (производитель — ОАО «Биомед» им. И.И. Мечникова, Московская обл.) [14, 15];
- 4) комплексный антиген (гликопротеины — гемагглютинин, нейраминидаза и липопротеины суперкапсида вируса гриппа) — живая гриппозная вакцина «Гриппол» субтипы $H_1N_1/H_3N_2/V$ (производитель — НПО «Петровакс Фарм», Москва) [14].

За титр реакции принимали максимальное разведение сыворотки, при котором еще наблюдался положительный результат.

Вакцинация стандартными вакцинами проводилась путем пересчета вакцинной дозы для человека на 1 кг веса мыши с использованием поправочного коэффициента [13].

Матричные растворы «АДВА» готовили, предварительно растворяя 1 мг вещества в 1 мл стерильного изотонического раствора натрия хлорида, и стерилизовали фильтрованием сквозь одноразовые фильтры «Millex» (Millipore) с диаметром пор 0.2 мкм. Приготовленные растворы «АДВА» вводили в хвостовую вену подопытных животных одновременно с введением антигена. Контролем служили иммунизированные антигенами животные без введения исследуемой субстанции (в качестве плацебо использовали стерильный физиологический раствор).

Для изучения специфической фармакологической активности «АДВА» использовали эквитерапевтические дозы (ЭТД) субстанции для крыс при пересчете с учетом поверхности тела:

$$\begin{aligned} \text{сут ЭТД} &= 0.0014 \text{ мг/кг} \times 39/6.5 = 0.0084 \text{ мг/кг}, \\ \text{сут 10 ЭТД} &= 0.0084 \text{ мг/кг} \times 10 = 0.084 \text{ мг/кг}, \\ \text{сут 40 ЭТД} &= 0.0084 \text{ мг/кг} \times 40 = 0.36 \text{ мг/кг}. \end{aligned}$$

Коэффициенты пересчета доз (мг/кг на мг/м^2) составили для крысы 6.5 и для человека 39 в зависимости от веса тела [16].

Кровь для исследования брали из подъязычной вены крысы в объеме 1.0–1.5 мл на 8-й день после иммунизации. Забор крови осуществлялся после 14–15-часового голодания в одинаковое время суток. Для получения сыворотки кровь центрифугировали при 1000g 15 мин.

Для всех количественных данных вычисляли групповое среднее арифметическое (M), стандартную ошибку среднего (SEM). Полученные результаты были обработаны на IBM PC/AT с помощью пакетов прикладных программ Statistica 5.5. Вероятность различий показателей средних в группах определяли с использованием t -критерия Стьюдента. Различия считали достоверными при уровне значимости $p < 0.05$.

1.6. Определение эндотоксина

Для определения присутствия в образцах «АДВА» липополисахаридов (ЛПС) использовали ЛАЛ-тест (лизат амебоцитов). 0.1 мл образца «АДВА» (5 мг/мл), стандартный образец или вода без эндотоксина смешивались с 0.1 мл ЛАЛ, инкубировали 1 час при 37 °С до формирования геля.

1.7. Изучение токсичности «АДВА»

Изучение острой токсичности «АДВА» проводили в соответствии с методическими рекомендациями по экспериментальному изучению новых лекарственных средств Фармакологического комитета Минздрава РФ. LD_{50} рассчитывали по методу Миллера и Тейнтера. Препарат «АДВА» в различных дозировках вводили однократно подкожно, внутрибрюшинно, внутримышечно и внутривенно.

2. Результаты и обсуждение

Ранее был выделен растительный полисахарид «АДВА» и изучены его химические свойства [17]. «АДВА» имеет молекулярную массу в интервале $20 \cdot 10^3 - 30 \cdot 10^4$ Да. Плохо растворим в воде, но хорошо растворим в солевых растворителях; практически нерастворим в органических растворителях, таких как эфир, хлороформ, ацетон, спирт, диметилсульфоксид. Обработка β -(1-3)- и β -(1-4)-гликозилгидролазами и α -амилазой показала, что полисахарид «АДВА» практически не содержит α -связей, преимущественно β -(1-4)-глюкозидные связи.

Была проведена работа по изучению спектральных характеристик полисахарида «АДВА». ИК-спектр представлен на рисунке.

В ИК-спектре «АДВА» отмечаются полосы поглощения: 3338 см^{-1} (OH^-); $2922, 2853 \text{ см}^{-1}$ (C-H^-); $2361, 2342 \text{ см}^{-1}$ ($=\text{N}^+\text{H}^-, \equiv\text{NH}^+, =\text{NH}^{+2}$); $1651, 1645 \text{ см}^{-1}$ ($\text{C}=\text{C}$, кристаллизационная вода) $1028, 1076, 1150 \text{ см}^{-1}$ ($\text{C-O}, \text{C-O-C}$, кольцевые колебания пиранозного цикла); в области 895 см^{-1} колебание характеризует β -конфигурацию гликозидной связи [18].

ИК-спектр «АДВА» показал характерные для полисахаридных структур полосы поглощения [19–21].

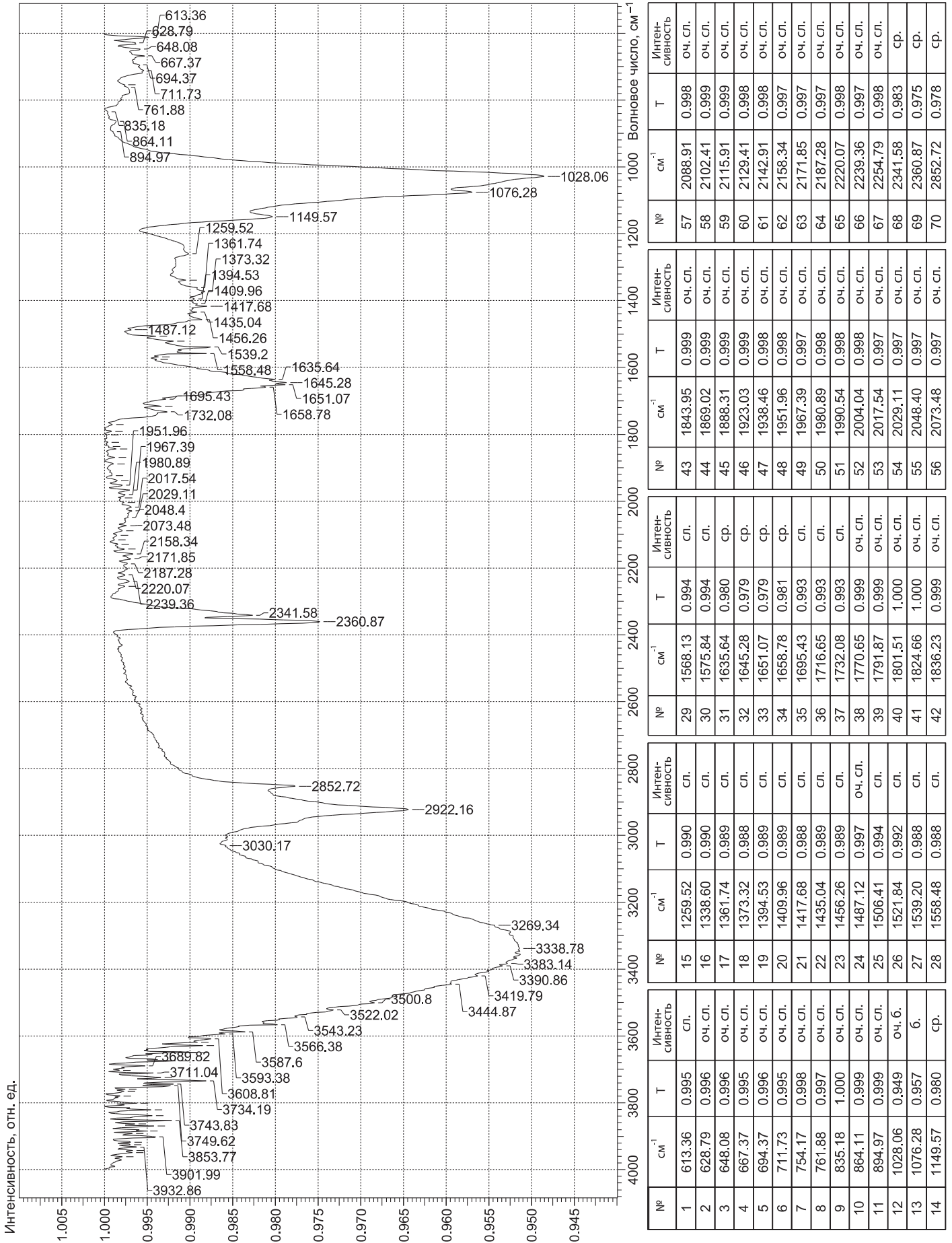
Было проведено определение моносахаридного состава, урановых кислот и белка, входящих в состав полисахарида «АДВА» (табл. 1). Белок не был обнаружен в образцах «АДВА».

Иммуноадьювантную активность полисахарида «АДВА» определяли по влиянию на синтез антител к эритроцитам барана, полисахаридному антигену менингококка, белковому экзотоксину возбудителя столбняка, гемагглютинином вируса гриппа.

В табл. 2 представлены титры антител в реакции прямой гемагглютинации, образующихся при иммунизации мышей (СВА \times С57В16)F₁ эритроцитами барана и «АДВА».

Введение субстанции «АДВА» приводило к увеличению титра специфических антител к эритроцитам барана в 2.82 раза (доза 0.0084 мг/кг); в 4.05 раза (доза 0.084 мг/кг) и в 4.78 раза (доза 0.336 мг/кг).

В табл. 3 представлены титры антител, образующихся в реакции гемагглютинации при иммунизации



ИК-спектр «АДВА».

Сокращения: оч. сл. — очень слабая, сл. — слабая, ср. — средняя, б. — большая, оч. б. — очень большая

Таблица 1

Моносахариды и уроновые кислоты, входящие в состав полисахарида «АДВА»

Навеска, мг	ТФУ к-та в 1 мл 0.553 мг инозита	Glc, мг	Gal, мг	Ar, мг	% сахаров	% уроновых кислот
2.79	2 (1.106)	1.86	0.0875	0.044	71	5.7

Таблица 2

Титры антител у мышей (СВА × С57В16)F₁ при иммунизации эритроцитами барана и «АДВА» (реакция прямой гемагглютинации)

	Титр реакции, n = 10			
	Контроль	На фоне введения субстанции «АДВА»		
		0.0084 мг/кг	0.084 мг/кг	0.336 мг/кг
1:30	1:40	1:70	1:90	
1:10	1:30	1:60	1:80	
1:20	1:60	1:80	1:90	
1:20	1:50	1:70	1:90	
1:20	1:70	1:90	1:100	
1:20	1:60	1:80	1:100	
1:20	1:60	1:70	1:90	
1:10	1:40	1:80	1:90	
1:20	1:70	1:90	1:100	
1:20	1:60	1:80	1:80	
M±SD	1:19.00±5.67	1:54.0±13.49	1:77.00±9.48	1:91.00±7.37

Таблица 3

Титры антител у мышей (СВА × С57В16)F₁ при иммунизации менингококковой полисахаридной вакциной и «АДВА» (реакция гемагглютинации)

	Титр реакции, n = 10			
	Контроль	На фоне введения субстанции «АДВА»		
		0.0084 мг/кг	0.084 мг/кг	0.336 мг/кг
1:10	1:40	1:40	1:60	
1:10	1:30	1:30	1:60	
1:10	1:60	1:50	1:70	
1:10	1:50	1:40	1:60	
1:10	1:70	1:30	1:70	
1:20	1:60	1:40	1:60	
1:10	1:60	1:40	1:70	
1:20	1:40	1:40	1:60	
1:10	1:70	1:50	1:60	
1:20	1:60	1:40	1:60	
M ± SD	1:13.0±4.8	1:25.0±5.2	1:40.00±6.61	1:63.00±4.83

мышей (СВА × С57В16)F₁ менингококковой полисахаридной вакциной и субстанцией «АДВА».

Из представленных данных видно, что введение субстанции «АДВА» приводило к увеличению титра специфических антител в сыворотках мышей, иммунизированных менингококковой вакциной, в 1.92 раза

(доза 0.0084 мг/кг); в 3.07 раза (доза 0.084 мг/кг) и в 4.8 раза (доза 0.336 мг/кг).

Результаты влияния субстанции «АДВА» на титр антител, образующихся при вакцинации мышей (СВА × С57В16)F₁ столбнячным анатоксином, представлены в табл. 4.

Таблица 4

Влияние субстанции «АДВА» на титр антител, образующихся при вакцинации мышей (СВА × С57В16)F₁ столбнячным анатоксином в составе АДС

	Титр реакции, n = 10			
	Контроль	На фоне введения субстанции «АДВА»		
		0.0084 мг/кг	0.084 мг/кг	0.336 мг/кг
1:20	1:180	1:200	1:240	
1:30	1:240	1:300	1:320	
1:20	1:200	1:320	1:340	
1:20	1:160	1:220	1:300	
1:20	1:240	1:280	1:340	
1:30	1:200	1:240	1:340	
1:20	1:200	1:320	1:360	
1:20	1:180	1:220	1:320	
1:40	1:260	1:280	1:300	
1:20	1:160	1:240	1:340	
M±SD	1:24.00±6.99	1:202.0±34.5	1:262.0±43.6	1:320.0±33.9

Таким образом, введение субстанции «АДВА» приводило к значительному увеличению титра реакции гемагглютинации с сыворотками мышей, иммунизированных белковой вакциной — столбнячным анатоксином, т.е. к увеличению способности образовывать специфические антитела: в эквитерапевтической дозе — в 8.41 раза; в дозе в 10 раз большей, чем эквитерапевтическая, — в 10.9 раза; в дозе в 40 раз большей, чем эквитерапевтическая, — в 13.3 раза.

Результаты влияния субстанции «АДВА» на титр антител, образующихся при вакцинации мышей (СВА × С57В16)F₁ гриппозной вакциной, представлены в табл. 5.

Внутривенное однократное введение субстанции «АДВА» приводило к увеличению титра реакции агглютинации/гемагглютинации с сыворотками мышей, иммунизированных гликопротеиновой вакциной (гемагглютинины вируса гриппа), т.е. к увеличению способности образовывать специфические антитела: в эквитерапевтической дозе — в 2.9 раза; в дозе в 10 раз большей, чем эквитерапевтическая, — в 4.51 раза; в дозе в 40 раз большей, чем эквитерапевтическая, — в 5.8 раза.

Влияние субстанции «АДВА» на титр антител, образующихся при вакцинации мышей (СВА × С57В16)F₁ гриппозной вакциной

		Титр реакции, $n = 6$			
		Контроль	На фоне введения субстанции «АДВА»		
			0.0084 мг/кг	0.084 мг/кг	0.336 мг/кг
	H ₁ N ₁	1:20	1:50	1:80	1:240
	H ₃ N ₂	1:20	1:60	1:80	1:320
	H ₁ N ₁	1:20	1:40	1:60	1:340
	H ₃ N ₂	1:20	1:50	1:80	1:300
	H ₁ N ₁	1:20	1:60	1:70	1:340
	H ₃ N ₂	1:10	1:60	1:80	1:340
	H ₁ N ₁	1:30	1:60	1:80	1:360
	H ₃ N ₂	1:20	1:60	1:70	1:320
	H ₁ N ₁	1:20	1:60	1:80	
	H ₃ N ₂	1:20	1:60	1:100	1:300
	H ₁ N ₁	1:10	1:50	1:100	
	H ₃ N ₂	1:10	1:50	1:100	1:340
M ± SD	H ₁ N ₁	1 : 20.0 ± 6.3	1 : 51.60 ± 7.52	1 : 78.3 ± 13.3	1 : 101.0 ± 14.7
	H ₃ N ₂	1 : 16.60 ± 5.16	1 : 55.00 ± 8.36	1 : 85.00 ± 12.24	1 : 111.6 ± 19.4

Таким образом, титр реакции агглютинации/гемагглютинации с сыворотками мышей, иммунизированных стандартными антигенами, на фоне введения субстанции «АДВА» увеличивался во всех сериях. Увеличение титра реакции свидетельствовало о повышении способности образовывать специфические антитела, т.е. о наличии у субстанции иммуноадьювантных свойств. Выраженность иммуноадьювантных свойств зависела от применяемой дозы субстанции «АДВА».

При введении минимальной дозы субстанции «АДВА» как иммуноадьюванта наиболее сильный иммунный ответ (т.е. более чем в 4 раза) у мышей наблюдался к белковому антигену (столбнячный анатоксин), наименьший (увеличение титра в 2 раза) — к полисахаридному (менингококковая полисахаридная вакцина) антигену, что соответствует представлениям о степени иммуногенности данных разновидностей химических веществ [22]. Таким образом, субстанция «АДВА», раствор для внутривенных инъекций, обладает иммуноадьювантными свойствами, наиболее выраженными в отношении белкового антигена.

Поскольку ЛПС грамотрицательных бактерий очень часто являются примесью в образцах соединений, выделяемых из биологических материалов, и стимуляторами иммунной системы, был проведен анализ образцов «АДВА» в ЛАЛ-тесте. Было показано отсутствие контаминации ЛПС.

Токсичность «АДВА» исследовали на мышах в интервале доз от 10 до 5000 мг/кг. «АДВА» при парентеральных способах введения (подкожный, внутримышечный, внутривенный) малотоксичен в острых опытах на животных (по данным параметров количественной токсичности). Максимально переносимая доза для под-

кожного введения (МПД (ЛД₁₀)) препарата составила 2650 мг/кг, средняя летальная доза (ЛД₅₀) — 3480 ± 205 мг/кг. При этом не обнаружено зависимости токсичности препарата от половой и линейной принадлежности мышей.

Эти эксперименты продемонстрировали низкую токсичность полисахарида «АДВА».

Заключение

«АДВА» имеет молекулярную массу в интервале $20 \cdot 10^3 - 30 \cdot 10^4$ Да. Плохо растворим в воде, но хорошо растворим в солевых растворителях; практически нерастворим в органических растворителях, таких как эфир, хлороформ, ацетон, спирт, диметилсульфоксид, практически не содержит α -связей, содержит преимущественно β -(1-4)-глюкозидные связи. Методами ГЖХ и ИК-спектроскопии определено, что глюкан состоит из глюкозы (не более 85%), арабинозы и галактозы (в следовых количествах), уроновых кислот (не более 15%).

Основной неразрешенной проблемой вакцинных штаммов остается сочетание безопасности и эффективности. Однако известный факт снижения иммуногенности антигена в зависимости от степени его чистоты ставит новую проблему — проблему оптимального адьюванта. «АДВА» не обладает сильностимулирующим воздействием на лимфоретикулярную ткань, не угнетает клеточный иммунитет, нетоксичен даже при высоких превышениях ЭТД, стимулирует гуморальный иммунитет к различного рода антигенам, но не вызывает реакции гиперчувствительности, не вызывает активный синтез специфических к его структуре антител и имеет высокую скорость биodeградации, что делает его безопасным и эффективным. Экспериментальные данные

позволяют сделать вывод, что «АДВА» пригоден для использования в качестве иммуноадъюванта.

Работа выполнена при технической и материальной поддержке лаборатории PolyLab Ltd. Pte. (Science Park 2, Сингапур).

Список литературы

1. Vogel F.R. // Dev. Biol. Stand. 1998. **92**. P. 241.
2. Glenny A.T., Pope C.G., Waddington H., Wallace V. // J. Path. Bact. 1926. **29**. P. 38.
3. Vogel F.R., Powell M.F. // Vaccine Design: the Subunit and Adjuvant Approach. N. Y., 1995. P. 234.
4. Houston W.E., Crabbs C.L., Kremer R.J., Springer J.W. // Infect. Immun. 1976. **13**, N 6. P. 1559.
5. Ara Y., Saito T., Takagi T. et al. // Immunology. 2001. **103**, N 1. P. 98.
6. Mohagheghpour N., Dawson M., Hobbs P. et al. // Adv. Exp. Med. Biol. 1995. **383**. P. 13.
7. Schijns V. // Curr. Opin. Immunol. 2000. **12**. P. 456.
8. Usov A.I., Bilan M.I., Klochkova N.G. // Botanica Marina. 1995. **38**. P. 43.
9. Vogel F.R. // Clin. Infect. Dis. 2000. **30**, N 3. P. 266.
10. Северин С.Е. Практикум по биохимии. М., 1989.
11. Albersheim P. // Methods Enzimol. 1987. **118**. P. 3.
12. Хорлин А.Я. Методы исследования углеводов. М., 1975.
13. Хабриев Р.У. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических средств. М., 2005.
14. Воробьева А.А. Медицинская микробиология, вирусология и иммунология. М., 2004.
15. Медуницын Н.В. Вакцинология. М., 1999.
16. Freireich E.J., Gehan E.A., Rall D.P. et al. // Cancer Chemother. Rep. 1966. **50**, N 4. P. 219.
17. Чекановская Л.А. Новый растительный глюкан как иммуноадъювант. Патент № 2331433. 2004.
18. Gutiérrez A., Prieto A., Martínez A.T. // Carbohydr. Res. 1996. **281**. P. 143.
19. Sekkal M., Dincq V., Legrand P., Huvenne J.P. // J. Mol. Struct. 1995. **349**. P. 349.
20. Kacuráková M., Wilson R.H. // Carbohydr. Pol. 2001. **44**. P. 291.
21. Proniewicz L.M., Paluszkiwicz C., Weselucha-Birzynska A. et al. // J. Mol. Struct. 2001. **596**. P. 163.
22. Ярилин А.А. Основы иммунологии. М., 2010.

Study of the structure and immunoenhancing activity of glucan «ADVA»

E. A. Generalov

Department of Biophysics, Faculty of Physics, M. V. Lomonosov Moscow State University, Moscow 119991, Russia.

E-mail: generals1179@gmail.com.

Experimental data to support possibility of usage of polysaccharides as adjuvants were obtained. Immunoadjuvant activity of polysaccharide «ADVA» when used in conjunction with antigens of different structure and chemical nature: a sheep red blood cell, meningococcal polysaccharide antigen, tetanus exotoxin protein, hemagglutinin of influenza virus was studied. The structure of the polysaccharide «ADVA» was characterized by IR-spectroscopy and GC methods. It was shown that «ADVA» is non-toxic. The possibility of using «ADVA» as immunoadjuvant is discussed.

Keywords: immunoenhancing activity, «ADVA», glucan, carbohydrates, polysaccharides.

PACS: 87.15.-v, 87.14.-g.

Received 14 June 2013.

English version: *Moscow University Physics Bulletin* 6(2013).

Сведения об авторе

Генералов Евгений Александрович — студент; тел.: (905) 730-50-73, e-mail: generals1179@gmail.com.