

*LLC Research and Production Complex «Vita-Li», Dmitrov.

Provides a short description of the treatment-and-prophylactic properties of marine brown algae and their BAS and integrated production process step-by-step obtaining biologically active substances and biogels. Stages of development of the technology and organization of the enterprise on processing of algae with getting biogels and functional foods based on BAS been shown.

Keywords: marine brown algae, algal biogels, BAS, the stages of production and output

Citation: Podkorytova A.V., Vafina L.H., Shashkina I.A. To the organization of the production of medical and preventive biogels from brown algae and to ensure their quality and safety. Health. Medical ecology. Science. 2014; 3(57): 44-46. URL: https://yadi.sk/d/vMHdW_H7USANg

Сведения об авторах

Подкорытова Антонина Владимировна, д.т.н., профессор, заведующая сектором водорослей ФГУП «ВНИРО», г. Москва, тел.: +79166290937; e-mail: podkor@vniro.ru;

Вафина Лилия Хаматовна, к.т.н., заведующая лабораторией ВНИРО-тест ФГУП «ВНИРО», г. Москва, тел.: +74992644121;

Шашкина Ирина Александровна, генеральный директор ООО НПК Вита-Ли, г. Дмитров, тел.: +79055885865.

© Коллектив авторов, 2014 г.

УДК 615.371: 025 (048.82)

О.Ю. Портнягина, Г.А. Набережных, В.И. Горбач, О.П. Вострикова, О.В. Сидорова, В.А. Хоменко, О.Д. Новикова, Т.Ф. Соловьева

ЛИПОСОМЫ, ПОКРЫТЫЕ ХИТОЗАНОМ, КАК АДЪЮВАНТЫ ДЛЯ ПЕРОРАЛЬНОЙ ИММУНИЗАЦИИ

ФГБУН «Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова» Дальневосточного отделения Российской академии наук, г. Владивосток

Изучено адъювантное действие липосом, покрытых ацилированным хитозаном. В качестве модельного антигена использован порообразующий белок наружной мембраны *Yersinia pseudotuberculosis*, который является одним из основных иммуногенных белков этой грамотрицательной бактерии.

Ключевые слова: липосомы, хитозан, адъювант, иммунизация

Цитировать: Портнягина О.Ю., Набережных Г.А., Горбач В.И., Вострикова О.П., Сидорова О.В., Хоменко В.А., Новикова О.Д., Соловьева Т.Ф. Липосомы, покрытые хитозаном, как адъюванты для пероральной иммунизации // Здоровье. Медицинская экология. Наука. 2014. №3(57). С. 46-48. URL: <https://yadi.sk/d/UCoDJnBcUSAQz>

Создание безопасных и эффективных вакцин является одной из актуальных задач современной медицины. Особый интерес представляет разработка новых мукозальных вакцин и способов их доставки. Известно, что включение антигена в липосомы повышает функциональную активность лимфоидных клеток кишечника [1], а модификация поверхности липосом хитозаном улучшает их мукоадгезивные свойства по отношению к слизистой оболочке желудочно-кишечного тракта и повышает биодоступность перорально вводимых соединений [2].

В связи с этим **целью** нашей работы является изучение адъювантного действия липосом, покрытых ацилированным хитозаном, при пероральной иммунизации животных порообразующим белком наружной мембраны *Y. pseudotuberculosis*.

Материалы и методы. Моноламельлярные липосомы, приготовленные методом обращенных фаз из лецитина, холестерина и диацетилфосфата (моль-

ное соотношение 2:1.5:0.2), и термоденатурированный мономер порина (ТМ) наружной мембраны *Y. pseudotuberculosis* в качестве модельного антигена были использованы нами для получения протеолипосом, которые обрабатывали низкомолекулярным хитозаном, полученным из коммерческого пищевого хитозана (ТУ 9283-174-00472012, ООО «Биополимеры») и ацилированным остатком 3-гидрокситетрадекановой кислоты. Мышей (CD-1, самцы, 5 мышей в группе) иммунизировали ТМ в липосомальной форме, внутрибрюшинно и перорально, однократно и трехкратно, в количестве 250 мкг/мышь. Соскобы и смывы со слизистой оболочки тонкого кишечника брали на 3-й, 6-й, 10-ый и 14-ый день после иммунизации. Наличие антител к ТМ в сыворотке крови (IgG) и в секрете тонкого кишечника (IgA) анализировали с помощью ИФА.

Результаты. Ранее нами было показано [3], что пероральная иммунизация мышей малыми дозами

антигена в липосомальной форме (25 мкг/мышь, 3-хкратно) не приводит к достоверному повышению в сыворотке крови уровня антител к порину *Y. pseudotuberculosis*. Однако увеличение дозы антигена в 10 раз при однократном пероральном введении его мышам позволило получить значительное увеличение титра IgG антител – до 3,4 lg.

Обращает на себя внимание тот факт, что однократная иммунизация порином в составе липосом, покрытых модифицированным хитозаном, приводит к статистически достоверному повышению уровня специфических IgA антител в секрете тонкого кишечника в 1,5–2 раза по сравнению с контролем. Этот эффект наблюдается как при внутрибрюшинном, так и при пероральном способе введения антигена.

Таким образом, установлено, что катионный полисахарид хитозан, ацилированный остатком 3-гидрокситетрадекановой кислоты, обладает адъювантным потенциалом. Показано, что однократная пероральная иммунизация мышей порином НМ *Y. pseudotuberculosis* в липосомальной форме стимули-

рует выработку сывороточных и секреторных специфических иммуноглобулинов. В связи с этим можно утверждать, что наноконструкции, включающие ацилированный хитозан, потенциально пригодны для использования в качестве носителей для создания пероральных вакцинных препаратов.

Работа проведена при финансовой поддержке гранта ДВО РАН (№ 12-III-A-05-063).

ЛИТЕРАТУРА

1. Исаенко Е.Ю. и соавт. Адъюванты в современной вакцинологии // *Анналы Мечниковского института*. 2013. № 4. С. 5-21.
2. van der Lubben I.M. et al. Chitosan and its derivatives in mucosal drug and vaccine delivery *Eur. J. Pharm. Sci.* 2001. Vol. 14. P. 201-207.
3. Portnyagina O.Yu. et al. Adjuvant properties of liposomes coated with chitosan *Portnyagina // European Science and Technology: materials of the 4th international research and practice conference, Munich, Germany, Apr. 10th–11th, 2013 Munich: Vela-Verlag Waldkraiburg*. 2013. Vol.1. P. 64-68.

Portnyagina O.Yu., Naberezhnykh G.A., Gorbach V.I., Khomenko V.A., Sidorova O.V., Vostrikova O.P., Novikova O.D., Solov'eva T.F.

LIPOSOMES COATED WITH CHITOSAN AS ADJUVANTS FOR ORAL IMMUNIZATION

G.B. Elyakov Pacific Institute of Bioorganic Chemistry, Far Eastern Branch, Russian Academy of Sciences, Vladivostok.

Adjuvant effect of liposomes coated with acylated chitosan was studied. Pore forming protein of outer membrane of *Yersinia pseudotuberculosis*, which is one of the major immunogenic proteins of this gram-negative bacteria was used as a model antigen.

Keywords: liposomes, chitosan, adjuvant, immunization.

Citation: Portnyagina O.Yu., Naberezhnykh G.A., Gorbach V.I., Khomenko V.A., Sidorova O.V., Vostrikova O.P., Novikova O.D., Solov'eva T.F. Liposomes coated with chitosan as adjuvants for oral immunization. *Health. Medical ecology. Science*. 2014; 3(57): 46-48. URL: <https://yadi.sk/d/UCoDJnBcUSAQz>

Сведения об авторах

Портнягина Ольга Юрьевна, к.б.н., старший научный сотрудник, лаборатории молекулярных основ антибактериального иммунитета ФГБУН «Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова» ДВО РАН, г. Владивосток, тел.: 8(974)7319825, e-mail: o_vl@piboc.dvo.ru;

Набережных Геннадий Александрович, к.х.н., старший научный сотрудник, лаборатории молекулярных основ антибактериального иммунитета ФГБУН «Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова» ДВО РАН, г. Владивосток, тел.: 8 (423) 23100719, e-mail: naber1953@mail.ru;

Горбач Владимир Иванович, к.х.н., старший научный сотрудник, лаборатории молекулярных основ антибактериального иммунитета ФГБУН «Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова» ДВО РАН, г. Владивосток, тел.: 8 (423) 23100719, e-mail: VIGorbach@bk.ru;

Вострикова Ольга Павловна, к.х.н., научный сотрудник, лаборатории молекулярных основ антибактериального иммунитета ФГБУН «Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова» ДВО РАН, г. Владивосток, тел.: 8 (423)23100719, e-mail: olgavostrik@yandex.ru;

Сидорова Ольга Вениаминовна, к.х.н., научный сотрудник, лаборатории молекулярных основ антибактериального иммунитета ФГБУН «Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова» ДВО РАН, г. Владивосток, тел.: 8 (423) 23100719, e-mail: olga_ximik@mai.ru;

Хоменко Валентина Александровна, к.х.н., старший научный сотрудник лаборатории молекулярных основ антибактериального иммунитета ФГБУН «Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова» ДВО РАН, г. Владивосток, тел.: 8 (423) 23100719, e-mail: homenko@mail.ru;

Новикова Ольга Данииловна, д.х.н., в.н.с. лаборатории молекулярных основ антибактериального иммунитета ФГБУН «Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова» ДВО РАН, г. Владивосток, тел.: 8 (423) 23100719, e-mail: novolga_05@mail.ru;

Соловьева Тамара Федоровна, д.х.н., г.н.с. лаборатории молекулярных основ антибактериального иммунитета ФГБУН «Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова» ДВО РАН, г. Владивосток, тел.: 8(423)23100719, e-mail: soltaf@mail.ru.

© Коллектив авторов, 2014 г.

УДК 577.1:577.2

Л.В. Слепченко, В.А. Голотин, Г.Н. Лихацкая, И.Ю. Бакунина, Л.А. Балабанова, В.А. Рассказов
**ПОЛУЧЕНИЕ МУТАНТНЫХ ФОРМ АЛЬФА-ГАЛАКТОЗИДАЗЫ МОРСКОЙ БАКТЕРИИ
PSEUDOALTEROMONAS SPP. KMM 701**

ФГБУН «Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова» Дальневосточного отделения Российской академии наук, г. Владивосток

Получены генетические конструкции мутантных форм альфа-галактозидазы морской бактерии *Pseudoalteromonas spp.* KMM 701 на основе данных мутагенеза *in silico* для изучения зависимости функциональности фермента от его структуры.

Ключевые слова: сайт-направленный мутагенез, рекомбинантный белок, экспрессия, ферментативная активность, термостабильность.

Цитировать: Слепченко Л.В., Голотин В.А., Лихацкая Г.Н., Бакунина И.Ю., Балабанова Л.А., Рассказов В.А. Получение мутантных форм альфа-галактозидазы морской бактерии *Pseudoalteromonas spp.* KMM 701 // Здоровье. Медицинская экология. Наука. 2014. №3(57). С. 48-49. URL: <https://yadi.sk/d/FjJeH0F9USARM>

Альфа-галактозидаза морской бактерии *Pseudoalteromonas spp.* KMM 701 (GenBank code: DQ530422) является важным ферментом для биотехнологического получения универсальной донорской крови группы O(I) [1]. Однако фермент не обладает достаточной термостабильностью для осуществления масштабного производства. Для выявления структурно-функциональных особенностей фермента был получен рекомбинантный аналог альфа-галактозидазы α -PsGal и построена высокоточная полноатомная модель 3-D структуры с использованием прототипа из *Lactobacillus acidophilus* NCFM (PDB code: 2XN2).

На основе анализа трехмерной структуры альфа-галактозидазы морской бактерии *Pseudoalteromonas sp.* KMM 701 были предсказаны точечные мутации аминокислотных остатков молекулы фермента для повышения его термостабильности. Методом ПЦР-опосредованного сайт-направленного мутагенеза

были получены мутантные формы с аминокислотными заменами E406P, V326E, Q410P, S412P, G463P для стабилизации петли, расположенной вблизи активного центра. Рекомбинантные белки с мутациями L68R, T44R, L411D были сконструированы для укрепления связи между двумя субъединицами. Мутанты D450A, D515A, E337A, C493N и W170A были получены для выявления механизмов каталитического действия и образования димера альфа-галактозидазы.

Работа была поддержана грантами РФФИ №13-04-00806, ДВО РАН №12-III-A-05-064, программой «Молекулярная и клеточная биология» 12-I-П6-10.

ЛИТЕРАТУРА

1. Balabanova L.A. et al. Molecular Characterization and Therapeutic Potential of a Marine Bacterium *Pseudoalteromonas spp.* KMM 701 α -Galactosidase. *Mar Biotechnol.* 2010; 12(1): 111-120.

Slepchenko L.V., Golotin V.A., Likhatskaya G.N., Bakunina I.Y., Balabanova L.A., Rasskazov V.A.
**PRODUCTION OF THE MARINE BACTERIUM *PSEUDOALTEROMONAS SPP.* KMM 701
ALPHA-GALACTOSIDASE MUTANTS**

G.B. Elyakov Pacific Institute of Bioorganic Chemistry, Far Eastern Branch, Russian Academy of Sciences, Vladivostok.

The marine bacterium *Pseudoalteromonas spp.* KMM 701 alpha-galactosidase mutants were constructed on the base of *in silico* mutagenesis data to study the effect of the enzyme structure on its functionality.

Keywords: site-directed mutagenesis, recombinant protein, expression, enzymatic activity, thermostability.

Citation: Slepchenko L.V., Golotin V.A., Likhatskaya G.N., Bakunina I.Y., Balabanova L.A., Rasskazov V.A. Production of the marine bacterium *pseudoalteromonas sp.* kmm 701 alpha-galactosidase mutants. *Health. Medical ecology. Science.* 2014; 3(57): 48-49. URL: <https://yadi.sk/d/FjJeH0F9USARM>