

Magistrinis darbas

Natalja Melenkova

Darbo vadovas – Dr. Gazim Bižanov

***Ginkgo biloba* ekstrakto adjuvantinis efektas, indukuojant specifinį imuninį atsaką prieš jaučio serumo albuminą vištų bei triušių modeliuose**

Pagal apibrėžimą vakcinavimas yra gana paprasta ir veiksminga procedūra, apsauganti žmogų ir gyvūną nuo susirgimų. Veiksmingos vakcinų kūrimas ir gamyba – tai ilgai trunkantis bei didelių ekonominių sąnaudų reikalaujantis procesas, kurio rezultatas ne visuomet būna sėkmingas. Vakcinavimas per gleivinę turi keletą pranašumų lyginant su parenteraliniu imunizavimu, nes geba sužadinti imuninį atsaką patekimo vietoje, be to gali sukelti specifinius imuninius atsakus nutolusiose nuo patekimo vietose. Tai yra išskirtinė gleivinių imuniteto savybė. Be vietinio atsako vakcinų, naudojamų per gleivines, sužadina taip pat sisteminį imunitetą, sukeldamos humoralinį ir ląstelinį atsakus, apsaugančius nuo patogenų, sklindančius oro-lašelinio būdu, pvz., gripo virusas, *Bordetella pertussis*, *Corynebacterium diphtheriae*, kurios patenka į organizmą per kvėpavimo takų gleivinių membranas.

Darniai funkcionuojanti gleivinių imuninė sistema sudaro nemažai praktinių problemų vakcinų tyrėjams. Dauguma Ag, mažais kiekiais patenkančių per gleivinę, pasižymi menku imunogeniškumu, todėl silpnai stimuliuoja sekretinio IgA ir dar silpniau – serumo IgG gamybą. Susiduriama su pagrindine vakcinavimo problema – kaip laiku sukelti specifinį imuninį atsaką prieš Ag nesukeliant susirgimo. Šią problemą gali išspręsti naujos kartos adjuvantas, naudojamas imunizavimui per gleivines. Populiarėjant fitoterapijai aktyvėja augalinės kilmės adjuvantų tyrimo kryptis. Tikslesnis supratimas apie augalinės kilmės medžiagų gebėjimą aktyvuoti imuninės sistemos funkcijas yra labai reikšmingas jų naudojimo tikslų apibrėžimui. Kaip galimus adjuvantų šaltinius mokslininkai tiria tokius augalus kaip *Clerodendron trichotomum* (Kim, Kim et al. 2009), *Uncaria tomentosa* (Jonasuskienė 2008), *Eucalyptus globulus* (Serafino, Sinibaldi Vallebona et al. 2008), *Salvia miltiorrhiza* (Yang, Son et al. 2008). JAV naudojamos vakcinų prieš gripo virusą sudėtyje jau yra patvirtintas augalinis adjuvantas QS21, išgautas iš medžio *Quillaja saponaria* Molina žievės (Vandepapeliere, Horsmans et al. 2008). QS21 – tai yra triterpenoidinės struktūros saponinų ekstraktas. *Dviskiaučio ginkmedžio* (lot. *Ginkgo biloba*) lapų sudėtyje esantys ginkgolidai ir bilobalidas yra panašios į terpenoidų struktūrą junginiai su keletais pakeitimais. Manoma, kad šio vaistinio augalo lapų ekstraktas gali pasižymėti imunomoduliacinėmis savybėmis.

Tolimesni augalų tyrimai yra aktualūs ir verti mokslinės visuomenės dėmesio.

Raktiniai žodžiai.

Mukozinis adjuvantas, *G.biloba*, kiaušinio trynio imunoglobulinas, IgY technologija.

TIKSLAI IR UŽDAVINIAI

Tikslai:

1. Įvertinti *G. biloba* ekstrakto adjuvantinį efektą vištų bei triušių modeliuose naudojant jaučio serumo albuminą kaip antigeną.
2. Įvertinti specifinių imunoglobulinų gamybos galimybę, naudojant vištų modelį.

Uždaviniai:

1. Nustatyti humoralinį imuninį atsaką vištų ir triušių modeliuose, imunizuotuose JSA su *G. biloba* kaip adjuvantu, išmatuojant imunoglobulinius IgA seilėse, IgG ir IgM serume bei IgY titrus kiaušinio trynyje.
2. Palyginti *G. biloba* ir nepilno Freundo adjuvanto adjutantinius efektus minėtuose modeliuose.
3. Įvertinti *G. biloba* kaip adjuvanto panaudojimo galimybes skirtinguose gyvūnų modeliuose.
4. Nustatyti imunoglobulino IgY koncentraciją vištų kiaušinio trynyje.
5. Apskaičiuoti specifinio imunoglobulino IgY išeią vištų modelyje naudojant *G. biloba* kaip adjuvantą.

IŠVADOS

1. *Ginkgo biloba* ekstraktas pasižymi imunomoduliacinėmis savybėmis dviejuose klasių gyvūnuose: paukščių bei žinduolių, naudojant JSA kaip antigeną. Skatinamas sisteminis humoralinis imuninis atsakas, matuojamas pagal IgA, IgM, IgG ir IgY.
2. *Ginkgo biloba* moduluojamas serumo IgG atsakas yra silpnesnis palyginus su tradiciniu nepilnu Freundo adjuvantu, tačiau beveik dvigubai stipriau skatina sekretinio IgA atsaką.
3. *Ginkgo biloba* imunomoduliacinės savybės pasireiškia skirtingai abiejų gyvūnų modeliuose. Sekretinio IgA atsakas yra stipresnis vištų modelyje, o serumo IgG atsakas yra beveik vienodas.

4. Imunoglobulino IgY koncentracija vištų kiaušinio trynyje lygu 13 mg/ml, naudojant *Ginkgo biloba* kaip adjuvantą.
5. Praktinė IgY išeiga, stimuliuota *Ginkgo biloba* ekstraktu sudarė apie 100 mg specifinio IgY viename kiaušinyje.

SANTRAUKA

***Ginkgo biloba* ekstrakto adjuvantinis efektas, indukuojant specifinį imuninį atsaką prieš jaučio serumo albuminą vištų bei triušių modeliuose**

Adjuvantai – tai yra neorganiniai ir organiniai junginiai, kurie stimuliuoja imuninę sistemą ir skatina sistemos atsaką prieš pageidaujamą antigeną, kurio imunogeniškumas savaime yra menkas. Siekiant sustiprinti organizmo atsaką į pateikiamą antigeną šie junginiai dažnai įtraukiami į vakcinų sudėtį.

Šiame darbe mes įvertinome augalinio *Dviskiaučio ginkmedžio* (DG) ekstrakto adjuvantines savybes triušių bei vištų modeliuose. Abiejų klasių gyvūnai buvo imunizuojami per gleivines jaučio serumo albuminu. Adjuvantinis efektas buvo vertinamas pagal IgA titrus seilėse, IgG ir IgM titrus gyvūnų serume ir IgY titrus vištų kiaušinio trynyje.

Gyvūnuose, imunizuotuose panaudojant DG kaip adjuvantą, pasireiškė stiprus sisteminis imuninis atsakas, ypač gleivinių (IgA pagrindu) ir humoralinis (IgG ir IgM pagrindu) palyginus su imunizacijomis be adjuvanto. Taip pat paaiškėjo, kad naudojant nepilną Freundo adjuvantą, humoralinis imuninis atsakas yra stipriausias.

Įvertinus IgA titrus paaiškėjo, imuninio atsako indukcija vištų modelyje didesnė, negu triušių modelyje. IgG titrai vištų ir triušių serumuose buvo panašūs, ir jų produkcija išliko stabili 8 savaitių laikotarpyje. IgY vertė buvo nustatinėjama vištų kiaušinio trynyje; IgY lygis išliko stabilus ir panašus į IgG atsaką per visą periodą. Skirtingai nuo IgA ir IgY, IgM buvo nustatyti jau po antros imunizacijos, tuo tarpu, kai IgA ir IgY imunoglobulinai buvo pastebimi praėjus trimis imunizacijoms.

Adjuvantas *Dviskiaučio ginkmedžio* pagrindu gali būti panaudotas kaip potencialus adjuvantas, skirtas imunizavimui per gleivines. Be to mūsų darbe įrodoma IgY produkcijos dideliais kiekiais galimybė. Pasiūlyta schema leidžia iš vienos vištos paruošti 36 g Ag-spezifinių IgY per vienus metus. Tai yra dešimtis kartų didesnė specifinių polikloninių antikūnų išeiga, palyginus su žinduolių IgG kiekiu, gaunamu iš kraujo serumo, todėl toks specifinių medžiagų gavimo būdas gali turėti milžinišką ekonominę naudą.

2010.06.01

SUMMARY

Natalja Melenkova

Adjuvant effect of *Ginkgo biloba* Extract on Immune Response to Bovine Serum Albumin in Chickens and Rabbits

Adjuvants are inorganic or organic compounds that stimulate the immune system and increase the response to a given antigen without having any specific antigenic effect in itself. They are often included in vaccines to enhance the recipient's immune response to a supplied antigen.

In present study we evaluated the adjuvant capacity of a plant *Ginkgo biloba* (GB) extract upon the mucosal immunization of rabbits and hens with bovine serum albumin. Adjuvant efficacy was evaluated by measuring the titres of IgA in saliva, IgG and IgM immunoglobulins in serum of the animals and IgY in chicken egg yolk.

Animals immunized using GB adjuvant showed strong cellular (IgA-based) and humoral (IgG and IgM) immune responses when compared to immunisations without adjuvant. It also became clear that the the immune response using Freund's adjuvant was highest in humoral immune response.

GB extract induced more important immune response in chickens when compared to rabbits as measured by IgA titres. The titres of IgG in hens and rabbits were found to be at similar levels and their production remained stable during 8 weeks. The levels of IgY were evaluated in chicken egg yolk and appeared stable over time thus resembling the IgG response. Different from IgA and IgY, the detectable levels of IgM in hens were observed after second GB extract-based immunisation, while IgA and IgY immunoglobulins were detected after third immunization of the animals.

We conclude that *G. biloba* extract can be used as potential mucosal adjuvant. Moreover, in our work we address the questions dealing with a large-scale IgY production. The proposed scheme enables to harvest up to 36 g of antigen-specific IgY per year from one chicken. This approach provides ten fold more important output of IgY when compared to IgG production from the serum of the animals. Such a production way of specific biological material might have tremendous economical benefit at a cost:yield ratio.