

УДК 615.015.21:[615.371:579.871.1:612.112.3.062]

СКРИНІНГ ПРЕПАРАТІВ-КАНДИДАТІВ В АД'ЮВАНТИ МІКРОБНОГО ПОХОДЖЕННЯ ЗА ЇХ ВПЛИВОМ НА ФАГОЦИТАРНУ АКТИВНІСТЬ IN VITRO

Елисеева І.В., Бабич Є.М., Скляр Н.І., Волянський Ю.Л., Білозерський В.І., Ждамарова Л.А., Мішукова С.А.,

Сидоренко Т.А., Ігумнова Н.І., Євсюкова В.Ю., Рижкова Т.А.

ІМІ мікробіології та імунології ім. І.І.Мечникова АМН України

Як показав досвід останньої великої епідемії дифтерії в світі, ускладнення епідситуації при умові зниження популяційного імунітету та відповідній соціально-економічній ситуації може виникнути будь в якій країні [1,2]. Тому цілком природно, що серед дослідників існує зростаючий інтерес до підвищення ефективності традиційних вакцин та створення захисних композицій з мукозальною активністю, які могли б покращити локальний захист організму проти збудників деяких інфекційних захворювань, в тому числі й проти дифтерії [3]. Пошуки саме в цьому напрямку пояснюються відсутністю впливу антитоксичних профілактичних препаратів на рівень носійства *Corynebacterium diphtheriae*, яке відіграє суттєву роль у підтримці резервуару інфекції серед населення. Як відомо, навіть високий рівень антитоксичного імунітету не захищає від інфікування, отже, це визначає необхідність корекції імунітету не лише за допомогою анатоксину, але й бактеріальних антигенів [4-7].

Російськими вченими створена дифтерійна бактеріальна вакцина «Кодівак» на основі глікопептида клітинних стінок нетоксигенного штаму *C.diphtheriae*, яка призначена для стимулювання антибактеріального протидифтерійного імунітету в носіїв інфекції [8]. Цей препарат здатний не лише стимулювати специфічний антибактеріальний імунітет, але має й ад'ювантну, мітогенну дію, активує комплемент за альтернативним шляхом, індукує специфічні реакції клітинного й гуморального імунітету, з якими пов'язана резистентність до патогенних бактерій [8-10].

Вчені з Великобританії пропонують вакцини, сконструйовані за іншим принципом, які можуть, за їхньою думкою, забезпечити нову стратегію мукозальної та системної імунізації проти дифтерії [11]. Здійснені ними спроби інкорпорувати низькі дози пальмітованого дифтерійного анатоксину (palmitified diphtheria toxoid) в ліпофільні імуностимулюючі комплекси, які містять Quil A (ISCOMS), виявилися імуногенними як при парентеральному, так і при мукозальному (пероральному та інтраназальному) шляхах введення. Створені вакцинні комплекси викликали як системну гуморальну імунну відповідь, так і клітинно опосередкований імунітет, підвищували продукцію γ -інтерферона та інтерлейкіна-5, стимулювали в значній мірі утворення локальних антитіл, формували навіть більш високий ступень захищеності в мор-

www.imiamn.org/journal.htm

ських свинок, аніж імунізація тварин еквівалентною дозою традиційної вакцини [11].

Іншими дослідниками вивчалися експериментальні композиції вакцинних препаратів з використанням різних ад'ювантів та носіїв [12-16].

Неспецифічні коливання імунологічної реактивності хазяїна здатні викликати як представники патогенних, так і умовно-патогенних для людини бактерій. Серед досліджених в цьому відношенні мікроорганізмів можна назвати *Esherichia coli*, *Salmonella typhi*, *Salmonella enteritidis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Vibrio cholerae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bordetella pertussis*, *Mycobacterium bovis*, *Corynebacterium parvum*, *Serratia marcescens*, *Streptococcus haemolyticus*, *Staphylococcus aureus*, представники бруцел, лактококів та ін. Всі вони, за даними літератури, в залежності від умов експерименту, здатні як стимулювати, так і пригнічувати неспецифічний імунітет. Зазначається, що різні компоненти бактеріальної клітини володіють різною імуномодулюючою активністю. Бактеріальні імуномодулятори обумовлюють зміни імунної відповіді не лише *in vivo*, але й *in vitro* [18].

Наші дослідження присвячені пошуку ефективних ад'ювантів мікробного походження для створення імуногенних мукозальних протидифтерійних препаратів. З цією метою ми вивчали вплив виготовлених нами фільтратів мікробних культур – представників коринебактерій та лактобацил на особливості фагоцитарної функції нейтрофільних лейкоцитів периферійної крові лабораторних тварин та людини *in vitro*. Вивчення функціональної активності цих клітин поряд з іншими тестами має важливе значення для оцінки можливих ад'ювантних властивостей досліджуваних речовин у відношенні їх впливу на неспецифічні механізми імунітету.

Матеріали і методи досліджень

В якості мікробних культур для виготовлення відповідних препаратів-кандидатів в ад'юванти й дослідження їх впливу на активність фагоцитозу були відібрані представники непатогенних коринебактерій - *Corynebacterium xerosis* (штам № 47), *Corynebacterium pseudodiphtheriticum* (штам № 49), *Corynebacterium diphtheriae* var. *mitis* (штам № 58, нетоксигенний), виділені в людей при профілактичному бактеріологічному обстеженні, та *Lactobacillus plantarum* (штам № 10), одержаний з Національного наукового центру «Інститут експериментальної та клінічної ветеринарної медицини».

Виготовлення потенційно активних речовин, які використовувались для подальшого вивчення, проводилося за наступною методикою. Добові агарові культури *C. diphtheriae* var. *mitis*, нетоксигенний, *Corynebacterium xerosis*, *Corynebacterium pseudodiphtheriticum*, вирощені на 8 % сироватковому агарі, *Lactobacillus plantarum*, вирощену на середовищі лактобакагар, змивали 4 % стерильним розчином NaCl і інкубували у термостаті 12 годин при 37 °С. Далі мікробні суспензії центрифугували при 3 тис. об./хв. (654 g) 20 хвилин. Осад ресуспендували в гіпертонічному розчині

та витримували у термостаті при 37 °С 2 години. Після 20-хвилинного центрифугування при 5 тис. об./хв. (1800 g) видаляли надосадову рідину та тричі промивали біомасу бактерій стерильним фізіологічним розчином. Після цього зразки мікробних суспензій обробляли ультразвуком частотою 44 кГц на лабораторному приладі УЗДН-2Т в режимі 4 рази по 4 хвилини з інтервалами для охолодження на льодовій бані. Визначали оптичну щільність досліджуваних речовин за допомогою приладу Densi-la-meter та доводили її розведенням до 3,0 одиниці за шкалою McFarland. Надалі всі мікробні дезінтеграти фільтрували через стерильні міліпорові фільтри «Владіпор» № 4 (діаметр пор 0,2 мкм). Досліджувані речовини перевіряли на стерильність, висіваючи на 5 % кров'яний агар (фільтрати коринебактерій) та середовище лактобакагар (фільтрат *L. plantarum*). Визначали вміст білку в біуретовій реакції за допомогою фотоелектроколориметрії.

Фагоцитарна реакція нейтрофільних лейкоцитів периферійної крові кроля та людини досліджувалась *in vitro* відповідно до методики [17]. Вплив досліджуваних речовин-кандидатів в ад'юванти на активність фагоцитозу вивчався після двогодинної експозиції (у співвідношенні 1:1)

Таблиця 1.- Результати вивчення впливу досліджуваних речовин-кандидатів у ад'юванти на активність фагоцитозу нейтрофілів периферійної крові кролів *in vitro*

Досліджувані речовини	Показники фагоцитозу <i>C. diphtheriae</i>	Тривалість фагоцитозу	
		10 хвилин (M±m)	30 хвилин (M±m)
Контроль № 1 (з латексом)	ІФ	0,6 ± 0,03	1,2 ± 0,2
	КФ	23,6 ± 1,9	39,5 ± 3,5
Контроль № 2	ІФ	2,4 ± 0,4	2,7 ± 0,3
	КФ	61,0 ± 4,9	66,3 ± 2,6
Фільтрат № 2	ІФ	2,1 ± 0,2	2,9 ± 0,3
	КФ	45,7 ± 2,9	38,0 ± 3,4
Фільтрат № 3	ІФ	3,4 ± 0,3	3,8 ± 0,3
	КФ	74,0 ± 2,5	72,5 ± 3,2
Фільтрат № 4	ІФ	3,0 ± 0,3	3,9 ± 0,3
	КФ	73,3 ± 2,6	75,0 ± 3,1

У контролі №1 КФ часточок латексу з 10 до 30 хвилин збільшився в 1,7 рази – від (23,6 ± 1,9) % до (39,5±3,5) %; ІФ виріс у 2 рази – до значення 1,2. При цьому фагоцитоз тест-об'єкту *C.diphtheriae* var. *mitis*, нетоксигенний, (контроль №2) відбувався значно активніше: вже через 10 хвилин КФ дорівнював (61,0 ± 4,9) %. Щодо зразків з фільтратами, то слід зауважити, що суттєвої різниці між 10-хвилинною та 30-хвилинною експозицією крові й досліджуваних речовин з мікробною суспензією не було ($t < 2$). Проте помітна різниця спостерігалась у порівнянні з контролем №2: вже через 10 хвилин в дослідних зразках з фільтратами №3

крові з фільтратами мікробних культур концентрацією Іг 9,0 КУО/мл у термостаті при 37 °С.

В якості об'єктів для фагоцитозу були використані штами *Staphylococcus aureus* (№46), *Corynebacterium diphtheriae* var. *mitis*, нетоксигенний (№58); як контроль № 1 була взята завісь часточок латексу. В якості контролю мікробних фільтратів був взятий фізіологічний розчин у співвідношенні з кров'ю 1:1 (контролі № 2 і № 3).

Фагоцитарну реакцію оцінювали за здатністю клітин поглинати тест-об'єкти за допомогою наступних показників: активності фагоцитозу або відсотку фагоцитарно-активних нейтрофілів (КФ), інтенсивності фагоцитозу (ІФ) – середньої кількості мікробів в 1 активному нейтрофільному лейкоциті. Також визначали показники пошкодження нейтрофілів (ППН) досліджуваними речовинами [17].

Одержані дані обчислювали методами варіаційної статистики.

Результати досліджень і обговорення

У першій серії дослідів вивчали вплив досліджуваних речовин на активність фагоцитозу нейтрофілів у крові кроля. Відповідні показники визначали через 10 хвилин та через 30 хвилин експозиції з тест-об'єктами (табл. 1).

(*C.pseudodiphtheriticum*) та №4 (*L.plantarum*) значення КФ були вищими, аніж в контролі №2 ($t > 2$). Намітилася також певна тенденція до зростання показників ІФ. Вплив фільтрату №2 (*C.xerosis*) навпаки, виявився пригнічуючим: КФ знизився у 1,7 рази ($t > 2$), дещо нижчим виявився й ІФ (табл. 1).

У другій серії дослідів вивчали вплив досліджуваних речовин на активність фагоцитозу нейтрофілів у крові людини. Відповідні показники визначали через 30 хвилин експозиції з тест-об'єктами *S.aureus* і *C.diphtheriae* var. *mitis*, нетоксигенний (табл. 2).

Таблиця 2. Результати вивчення впливу досліджуваних речовин–кандидатів у ад'юванти на активність фагоцитозу нейтрофілів периферійної крові людини *in vitro*

Досліджувані речовини	Показники фагоцитозу	Тест-об'єкти фагоцитозу	
		S.aureus (M±m)	C.diphtheriae (M±m)
Контроль № 3	ІФ	1,2±0,2	1,4±0,2
	КФ	39,5 ± 2,4	45,3 ± 2,9
Фільтрат № 1	ІФ	1,2±0,2	2,7±0,3
	КФ	41,7 ± 2,8	60,5 ± 3,5
Фільтрат № 2	ІФ	1,2±0,2	2,9±0,3
	КФ	42,3 ± 2,9	61,0 ± 3,4
Фільтрат № 3	ІФ	1,9±0,3	6,8±0,3
	КФ	46,0 ± 3,5	83,0 ± 2,7
Фільтрат № 4	ІФ	1,9±0,3	3,8±0,3
	КФ	49,5 ± 3,5	62,0 ± 3,4
Фільтрати № 3 + № 4	ІФ	1,0±0,2	2,7±0,3
	КФ	39,7 ±2,8	59,0 ± 4,9

Звертає на себе увагу, що активність фагоцитозу мікробних клітин *C.diphtheriae* в середньому значно (в 1,4 рази) перевищувала поглинання нейтрофілами культури *S.aureus*: (43,1 ± 3,0) % проти (61,8 ± 3,5) % (табл.2).

Результати вивчення впливу досліджуваних фільтратів на активність фагоцитозу *S.aureus* виявилися статистично незначущими для більшості з них. Лише фільтрат №4 (*L.plantarum*) призвів до істотного ($t > 2$) підвищення КФ, але ІФ збільшився не так суттєво – з 1,2 до 1,9. Проте показники КФ для тест-об'єкту *C.diphtheriae* збільшилися в 1,3-1,8 рази для всіх досліджуваних зразків ($t > 2$). Ці дані підтверджують дані літератури про те, що захисна дія імунomodulatorів не є універсальною, тобто виявляється не при всіх інфекціях [18].

Особливо слід відзначити ад'ювантний вплив фільтрату №3 (*S.pseudodiphtheriticum*): КФ досягнув (83,0 ± 2,7) %, а ІФ виріс у 4,9 рази у порівнянні з контролем №3 і дорівнював 6,8. Слід відзначити, що у найактивнішого за показниками КФ та ІФ фільтрату №3 при найбільшому вмісті білку – 11 мг/мл – виявився й підвищений ППН – 0,14. У фільтраті №4 вміст білку складав 7,0 мг/мл, ППН дорівнював 0,01 при досить високих значеннях КФ – (62,0 ± 3,4) % та ІФ – 3,8. ППН інших досліджуваних речовин (фільтрати №1 та №2), дорівнювали 0 при мінімальних у серії зразків показниках концентрації білку, що свідчить про їх не токсичність *in vitro*. Отже, щоб знизити токсичність фільтрату №3 (шляхом розведення) та зберегти його фагоцитоз-стимулюючі властивості, була перевірена дія суміші фільтратів №3 (*S.pseudodiphtheriticum*) та №4 (*L.plantarum*), які показали найкращі результати стимулювання фагоцитарної реакції за результатами першої та другої серії експериментів. Суміш, всупереч очікуванням, втратила стимулюючий потенціал вихідних компонентів, хоча й була актив-

нішою за показники контролю №3. При цьому вона набула, за значенням ППН, більшої токсичності: показник пошкодження нейтрофілів (ППН) сягнув до значення 0,28, що на два порядки перевищує норму.

Фільтрат №1 істотно не відрізнявся від дії речовини №4 за рівнем КФ: (60,5 ± 3,5)%; рівень ІФ складав 2,7. Фільтрат №2, виготовлений з мікробної маси *S.xerosis*, в даних умовах експерименту виявив неоднозначну дію: пригнічуючи активність нейтрофільного фагоцитозу в лабораторній тварини – (38,0 ± 3,4) %, він підвищував його у порівнянні з контролем в крові людини – (61,0 ± 3,4) % (табл. 1 і 2). Значення ІФ в обох випадках дорівнювали 2,9.

Судячи з даних, представлених у таблицях 1 і 2, реакція нейтрофілів на контакт із досліджуваними речовинами істотно відрізнялася за показниками КФ для людини та лабораторних тварин. При цьому дія фільтратів виявилася неоднозначною: №4 був активнішим до стимуляції фагоцитозу кролячої крові, а №№ 2 і 3, виготовлені на основі мікробних культур непатогенних коринебактерій, – людської.

Висновки

Всі досліджувані речовини-кандидати в ад'юванти підсилювали фагоцитарну реакцію нейтрофілів периферійної крові людини як одного з показників неспецифічного імунітету. Це свідчить про доцільність подальшого вивчення їх ад'ювантної активності щодо показників клітинного захисту й гуморального протидифтерійного імунітету при оральному застосуванні дифтерійного анатоксину з перспективою створення захисних вакцинних композицій з мукозальною активністю.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Eighth International Meeting of the European Laboratory Working Group on Diphtheria and the Diphtheria Surveillance Network - June 2004: Progress is needed to sustain control of diphtheria in European Region /Indexed in MedLine as: Euro Surveill 2004; 9(11):47-50 Published online November 2004.
2. Diphtheria Outbreak Russian Federation, 1990-1993 Morbidity and Mortality Weekly Report (MMWR), vol. 42, № 43, November 5, 1993.
3. Pearay L. Ogra, Howard Faden, Robert C. Welliver / Vaccination Strategies for Mucosal Immune Responses // Clin Microbiol Rev. – 2001. – №14,(2). – P.430–445.
4. Состояние антитоксического иммунитета у носителей дифтерийной палочки / Сухорукова Н.Л., Черешкина Н.М. Зимица А.И. и др. // Журн. микробиол. – 1966. – № 4. –С.39-43.
5. Маркина С.С., Максимова Н.М., Лазикова Г.Ф. Заболеваемость дифтерией в России в настоящее время // Журн. микробиол. – 2005. – №1. – С.31-37.
6. Специфические антитела и их роль в формировании противодифтерийного иммунитета / Шмелева Е.А., Макарова С.И., Батурина И.Г. и др. // Журн. микробиол. – 2005. – № 1. – С.38-43.
7. Мазурова И.К. Роль противомикробных антител в пассивной защите организма от дифтерийной инфекции // Острые детские инфекции (Сб. трудов МНИИ-ЭиМ). –М., 1978. –Т.19. –С.26-34.
8. Характеристика дифтерийной бактериальной вакцины и результаты ее исследования в эксперименте и на людях / Шмелева Е.А., Никитич Д.П., Кузиков А.Н. и др. // Тезисы докладов V Всероссийского съезда микробиологов и эпидемиологов. – М., 1985. – С.69-71.
9. Прямая и Ig-опосредованная реактивность нейтрофилов человека к пептидогликану *Corynebacterium diphtheriae* / Маянский А.Н., Шмелева Е.А., Крылова Н.И. и др. // Журн. микробиол. – 1984. – № 2. – С.99-101.
10. Изучение in vitro влияния бактериальной дифтерийной вакцины на спонтанное розеткообразование иммунокомпетентных клеток доноров / Попкова С.М., Шмелева Е.А., Сафронова А.В., Дремина И.С. // Журн. микробиол. – 1988. – № 5. – С.116-117.
11. Induction of protective and mucosal immunity against diphtheria by a immune stimulating complex (ISCOMS) based vaccine. / Aguila A, Donachie A.M, Peyre M, McSharry C.P, Sesardic D, Mowat A.M. // Vaccine. – 2006. – №12;24. – P.5201-10.
12. Rydell N., Sjöholm I. Mucosal vaccination against diphtheria using starch microparticles as adjuvant for cross-reacting material (CRM197) of diphtheria toxin // Vaccine. – 2005. – №15;23(21). – P.2775-83.
13. Mirchamsy H., Neway T., Hamed M., Pilet C. Adjuvanticity of pGPL-M and LRS in the immune responses of monkeys to oral immunization with diphtheria and tetanus toxoids // Comp Immunol Microbiol Infect Dis. – 1997. – №20 (1). – P.13-20.
14. Chitosan microparticles for mucosal vaccination against diphtheria: oral and nasal efficacy studies in mice / van der Lubben I.M., Kersten G., Fretz M.M. et al. // Vaccine. – 2003. – №28;21(13-14). – P.1400-1408.
15. Intranasal immunization with genetically detoxified diphtheria toxin induces T cell responses in humans: www.imiamn.org/journal.htm
- enhancement of Th2 responses and toxin-neutralizing antibodies by formulation with chitosan. / McNeela EA, Jabbal-Gill I, Illum L, Pizza M, Rappuoli R, Podda A, Lewis DJ, Mills KH.// Vaccine. – 2004. – №25;22(8). – P.909-914.
16. In vivo uptake of an experimental microencapsulated diphtheria vaccine following sub-cutaneous immunisation. / Peyre M., Fleck R., Hockley D., Gander B., Sesardic D. // Vaccine. – 2004. – №23;22(19). – P.2430-2437.
17. Лабинская А.С. Микробиология с техникой микробиологических исследований // М.: Медицина, 1978. – 394с.
18. Прилепин Н.А., Семенов Б.Ф. Бактерии и бактериальные вакцины как неспецифические модуляторы иммунологической реактивности // Журн. микробиол. – 1980. – № 11. – С.5-11.

**УДК 615.015.21:[615.371:579.871.1:612.112.3.062]
СКРИНІНГ ПРЕПАРАТІВ-КАНДИДАТІВ В АД'ЮВАНТИ МІКРОБНОГО ПОХОДЖЕННЯ ЗА ЇХ ВПЛИВОМ НА ФАГОЦИТАРНУ АКТИВНІСТЬ IN VITRO**

Елїсеєва І.В., Бабич Є.М., Скляр Н.І., Волянський Ю.Л., Білозерський В.І., Ждамарова Л.А., Мишукова С.А., Сидоренко Т.А., Ігумнова Н.І., Євсюкова В.Ю., Рижкова Т.А.

Здійснені дослідження присвячені пошуку ефективних ад'ювантів мікробного походження для створення імуногенних мукозальних протидифтерійних препаратів. Вивчений вплив фільтратів мікробних культур – представників коринебактерій та лактобацил – на активність фагоцитарної реакції нейтрофільних лейкоцитів периферійної крові лабораторних тварин та людини in vitro. Найбільш перспективними за дослідженнями показниками виявилися фільтрати, виготовлені з *C.pseudodiphtheriticum* та *Lactobacillus plantarum*.

Ключові слова: ад'юванти, фагоцитоз, протидифтерійні вакцини, коринебактерії, лактобактерії.

**УДК 615.015.21:[615.371:579.871.1:612.112.3.062]
СКРИНІНГ ПРЕПАРАТОВ-КАНДИДАТОВ В АД'ЮВАНТИ МІКРОБНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ ПО ИХ ВЛИЯНИЮ НА ФАГОЦИТАРНУЮ АКТИВНОСТЬ IN VITRO**

Елїсеєва І.В., Бабич Є.М., Скляр Н.І., Волянський Ю.Л., Білозерський В.І., Ждамарова Л.А., Мишукова С.А., Сидоренко Т.А., Ігумнова Н.І., Євсюкова В.Ю., Рижкова Т.А.

Предпринятые исследования посвящены поиску эффективных ад'ювантов микробного происхождения для создания иммуногенных противодифтерийных вакцинных препаратов для перорального введения. Изучено влияние фильтратов микробных культур – представителей коринебактерий и лактобацилл – на активность фагоцитарной реакции нейтрофильных лейкоцитов периферической крови лабораторных животных и человека in vitro. Наиболее перспективными по исследованным показателям оказались

фильтраты, приготовленные из культур *C.pseudodiphtheriticum* и *Lactobacillus plantarum*.

Ключевые слова: адьюванты, фагоцитоз, противодифтерийные вакцины, коринебактерии, лактобациллы.

UDC 615.015.21:[615.371:579.871.1:612.112.3.062]

SCREENING OF MICROBIAL ORIGIN PREPARATIONS WITH POTENTIAL ADJUVANT PROPERTIES ACCORDING TO THEIR INFLUENCE UPON PHAGOCYTOTIC ACTIVITY IN VITRO

Yelyseyeva I.V., Babych Ye.M., Sklyar N.I., Volyansky Yu.L., Belozersky V.I., Zhdamarova L.A., Myshukova S.A., Sydorenko T.A., Igumnova N.I., N.I.Yevsyukova V.Yu., Ryzhkova T.A.

Undertaken study is devoted to search of effective microbial origin adjuvants for development immunogenic oral vaccines against diphtheria. It's investigated influence of filtrates of microbial cultures prepared from strains of *Corynebacterium* and *Lactobacillus* spp. upon phagocytic activity of human's and animal neutrophilic leukocytes in vitro. Filtrates prepared from *C. pseudodiphtheriticum* and *L. plantarum* appeared as the most perspective ones according to investigated indices of phagocytosis.

Key words: adjuvants, phagocytosis, vaccines against diphtheria, *Corynebacterium*, *Lactobacillus*.