

ДО ПИТАННЯ РОЗРОБКИ КОМПЛЕКСНОЇ ДИФТЕРІЙНОЇ ВАКЦИНИ

З БАКТЕРІАЛЬНИМ АД'ЮВАНТОМ

Державна установа «Інститут мікробіології та імунології

ім. І. І. Мечникова НАМН України» (м. Харків)

babych\_em@ukr.net

**Зв'язок публікації з плановими науково-дослідними роботами.** Дослідження проводилися відповідно до теми науково-дослідної роботи «Визначити вплив кашлюково-дифтерійних антигенів на клітинно-опосередкований імунітет та обґрунтувати концептуальні положення створення вакцин у форсуючому режимі» (№ державної реєстрації 0117U002276).

**Вступ.** Уроки великої епідемії дифтерії у країнах східної Європи у 90-х роках минулого сторіччя примушують медичну громадськість не забувати про загрозу вибухового сплеску дифтерійної інфекції. Світові статистичні дані захворюваності на дифтерію свідчать про сучасну тенденцію до зростання числа захворювань впродовж останніх років: так, якщо у світі у 2015 р. зареєстровано 4 535 випадків, то через рік їх було вже 7 101, у 2017 р. – 8 819, а у 2018 р. повідомлено до ВООЗ про 16 648 випадків дифтерії [1]. Показники базисного темпу росту по раках за цей період помітно зросли: 1,6; 1,9 і 3,7, відповідно. Одиначні випадки захворювань в Україні впродовж останніх 10 років – це лише верхівка айсбергу, оскільки передача інфекції через бактеріоносіїв та латентні форми дифтерії безконтрольно триває. Показники специфічної профілактики дифтерії в Україні в цей період залишалися на низькому рівні: так, у 2016 р. охоплення щепленнями АКДПЗ складало 19 %, у 2017 р. – 50 %, у 2018 р. – 69 %, що значно нижче середнього рівня у світі – 86 % [1,2,3]. Виходячи з офіційної доктрини ВООЗ стосовно щеплень проти дифтерії, рівень специфічного захисту в Україні, може виявитися недостатнім для стримування вірогідних епідемічних ускладнень, і можна очікувати суттєвого росту захворюваності [4].

Аналіз кількості випадків дифтерії, зареєстрованих в Україні починаючи з кінця 80-х років та відповідні показники охоплення щепленнями проти дифтерії, відкриває парадоксальне явище: суттєвий ріст захворюваності розпочався з 1990 р. (109 захворювань) і супроводжувався щорічним збільшенням відсотку охоплення населення АКДПЗ від 42 % у 1989 р. до понад 90 %, починаючи з 1993 р.; максимальна кількість випадків дифтерії у 1994-1996 рр. (відповідно, 3003, 5277 і 3159 захворювань) супроводжувалась максимальними – майже 100-відсотковими – показниками охоплення населення АКДПЗ (табл. 1).

Тобто спинити епідемію підвищенням відсотку щеплених осіб не вдалося. Характерними особливостями епідемічного підйому був значний відсоток щеплених серед хворих на дифтерію (серед дітей з дитячих дошкільних закладів – 84 %, серед школярів – 86,3 %, серед дорослих контингентів з груп ризику – 60 %), а також серед померлих від дифтерійної інфекції осіб (від 20,4 % у 1993 р. до 35,5 % у 1996 р.), переважання у віковій структурі захворюваності підлітків та дорослих [5].

Отже дифтерія, яку відносять до керованих засобами вакцинопрофілактики дитячих інфекцій, насправді виявляється керованою лише частково – у відношенні попередження розвитку важких токсичних форм захворювання. Циркуляція збудника серед населення залишається осторонь заходів специфічної профілактики [6].

Впродовж ряду років в нашій лабораторії проводяться дослідження з розробки комплексної дифтерійної вакцини з бактеріальним компонентом, яка володіє не лише захисною дією проти захворювання на дифтерію, але й спрямована проти колонізації збудником дихальних шляхів та санації бактеріоносіїв *C. diphtheriae* [7-10]. Розробка бактеріального ад'юванту ведеться у руслі двох сучасних стратегій конструювання вакцин, а саме: анти-адгезивної стратегії, яка впроваджує препарати, попереджуючі колонізацію патогеном слизових оболонок макро-

**Таблиця 1 – Захворюваність на дифтерію та охоплення щепленнями в Україні за період 1987-2018 рр.**

Роки	Дифтерія (абс.)	Інтенсивні показники, на 100 тис.	АКДПЗ, %	Роки	Дифтерія (абс.)	Інтенсивні показники, на 100 тис.	АКДПЗ, %
1987	92	0,18	78	2003	158	0,33	97
1988	81	0,16	79	2004	123	0,26	99
1989	59	0,11	42	2005	98	0,21	96
1990	109	0,21	79	2006	68	0,14	98
1991	1103	2,12	85	2007	81	0,17	98
1992	1553	2,98	88	2008	61	0,13	90
1993	2976	5,7	93	2009	19	0,04	«-»
1994	3003	5,76	97	2010	17	0,04	52
1995	5277	10,2	98	2011	8	0,02	50
1996	3159	6,16	99	2012	5	0,01	76
1997	1364	2,68	99	2013	6	0,01	«-»
1998	706	1,4	98	2014	4	0,009	«-»
1999	375	0,75	99	2015	2	0,005	23
2000	365	0,74	99	2016	4	0,009	19
2001	283	0,58	99	2017	0	0	50
2002	285	0,59	99	2018	10	0,02	69

організму і подальшу його інвазію, а також стратегії потенціювання навченого уродженого імунітету, який може захистити від інфікування та сприяти елімінації збудника з організму при імунodefіцитних станах, з якими пов'язано і тривале бактеріоносійство, лікуванню зворотних імунотолерантних станів для підвищення імунної захищеності організму після вакцинації [11,12].

Адгезія генетично запрограмована і має важливе значення для виживання виду. Мікробна адгезія – це взаємодія клітини з поверхнею, що передбачає одночасне зв'язування багатьох молекул адгезинів з багатьма рецепторами молекул з утворенням великої кількості незалежних один від одного зв'язків. Адгезія бактерій характеризується специфічністю: молекула адгезину – полімеру, розташованого на поверхні клітини, взаємодіє з рецептором – полімером, розташованим на поверхні клітин організму господаря. Адгезія залежить від здатності клітин синтезувати і «виставляти» адгезини. Обидва процеси знаходяться під генетичним і фенотипічним контролем. Є думка, що мікроорганізми можуть дуже тонко і точно регулювати своє положення (вільне або прикріплене) завдяки синтезу певних ферментів, зміні заряду та ступеню гідрофобності своєї поверхні, синтезу поверхнево-активних речовин, утворенню виступів, ділення, хемотаксису, тощо. При адгезії діє складний комплекс сил: хімічні зв'язки поміж поверхнями, що взаємодіють, флуктуація зарядів та мозаїчний заряд, енергія десольватації, електростатичні сили тяжіння та відштовхування, сили Ван-дер-Ваальса, гідрофобні взаємодії [13].

За біохімічним складом бактеріальні адгезини можуть бути протеїнами, ліпідною частиною ліпідної кислоти або вуглеводами. Слабкі гідрофобні взаємодії, опосередковані ліпідними кислотами, можуть сприяти початковому прилипанню до поверхні господаря [14]. Поверхня грам-позитивних бактеріальних клітин містить численні білкові адгезини, які дозволяють їм колонізувати різні тканинні ділянки. Багато з цих адгезивних білків ковалентно приєднані до пептидоглікану клітинної стінки ферментами сортази [15,16].

Багато видів коринібактерій спочатку були виділені або з абіотичних, або з біотичних поверхонь, отже, в цій групі бактерій можна очікувати, як специфічних, так і неспецифічних механізмів адгезії [16]. Адгезія *C. diphtheriae* – багатофакторний процес. *C. diphtheriae* здатна зв'язувати різні типи епітеліальних клітин специфічним для штаму способом. До цього часу було визначено ряд білків, що беруть участь у цьому процесі, підкреслюючи складність цієї події: SpaA type pili, NanH (DIP0543), CDiLAM, DIP1621, 67-72p (DIP0733), DIP1546, DIP2093. Тим не менш, делеція або порушення одного з цих білків не призводить до повної втрати адгезивної здатності, що вказує на альтернативні механізми зв'язування і свідчить про те, що вирішальною для цієї події може бути комбінація білків [16]. *C. diphtheriae* містить гени для білків, які називаються MSCRAMMS, завдяки їх здатності опосередковувати приєднання до фібриногену або колагену [17]. Зв'язування з фібриногеном, фібронектином та колагеном спостерігалось у багатьох дослідженнях для токсигенних та нетоксигенних штамів *C. diphtheriae*, а також ізолятів *C. ulcerans*. Так,

мутація DIP0733 погіршує зв'язування з цими білками в різному ступені, але не блокуючи його повністю, Крім того, *C. diphtheriae* також здатна зв'язувати еритроцити людини. Завдяки цій здатності *C. diphtheriae* може поширюватися по всьому тілу через потік крові [17]. При порівняльному аналізі здатності адгезії різних ізолятів *C. diphtheriae* до епітеліальних клітин штами демонструють специфічні для штаму відмінності. Примітно, що швидкості адгезії є не тільки специфічними для штаму, але і специфічними для клітинної лінії, яку використано для вивчення адгезії [17].

Ці білки можуть мати функцію патогенності, але працюють у поєднанні з іншими білками або токсинами в певних умовах навколишнього середовища. Види коринібактерій можна виділити з широкого спектру екологічних ніш, таких як синтетичні поверхні, їжа, вода, ґрунт, тварини та людина, а також інші. Тому адгезія патогенних коринібактерій може бути не специфічним механізмом, а скоріше загальним явищем у взаємодії господар-збудник. Білки, що беруть участь у цьому процесі, можуть бути визначені як нішеві фактори, а не детермінанти вірулентності [16].

Для того, щоб ефективно впливати на нього при конструюванні профілактичних препаратів антиадгезивної дії потрібно урахувати різноманітні фактори, які визначають результат взаємодії патогену з макроорганізмом. Істотну характеристику адгезивних властивостей досліджуваних культур мікроорганізмів може дати встановлення залежності адгезії від рН.

Відомо, що за впливом рН на адгезію клітин бактерії розподіляються на групи, а саме: 1) адгезія не змінюється в досліджених межах рН; 2) адгезія зменшується із збільшенням рН; 3) адгезія має максимум при середніх значеннях рН. Внесення у середовище для адгезії білків, полісахаридів, поверхнево-активних речовин значно змінює процес адгезії. Так, адгезія *Streptococcus faecium*, *S. sanguis* пригнічувалася овальбуміном, кролячою сироваткою, альбуміном сироватки, слиною та конканаваліном, тому що вони займали місце адгезії. Проте є повідомлення, що білок у середовищі може збільшувати адгезію декотрих бактерій, і в цьому випадку встановлюється зв'язок через адсорбований білок [18].

**Мета роботи** – визначити вплив нативних антигенних комплексів збудника дифтерії, одержаних при різних значеннях рН, на адгезивні властивості *C. diphtheriae* та активність фагоцитозу макроорганізму для удосконалення технології виготовлення комплексної дифтерійної вакцини проти маніфестного прояву та персистуючої форми дифтерійної інфекції.

**Об'єкт і методи дослідження.** Об'єкти дослідження – музейний штам *C. diphtheriae gravis, tox+*, № 255, експериментальні бактеріальні антигенні препарати, зразки крові людини та кроля. Виготовлення експериментальних антигенних препаратів з мікробної маси *C. diphtheriae* за допомогою ультразвукової дезінтеграції готували, основуючись на авторському способі з варіюванням значень рН – 5,5 та 7,2 [10]. Біохімічні дослідження антигенних препаратів, виготовлених з мікробних клітин *C. diphtheriae*, здійснювалися за даними спектрофотометрії. Вплив експериментальних антигенних препаратів на адгезивні

властивості тест-штаму *C.diphtheriae* досліджували та оцінювали за відомим способом [19,20]. Визначення впливу досліджуваних антигенних препаратів на активність фагоцитозу проводилося прямим морфологічним методом [21]. Одержані результати оцінювалися за допомогою статистичних методів з використанням програми Microsoft Excel [22].

**Результати дослідження та їх обговорення.** Біохімічне дослідження отриманих експериментальних антигенних препаратів *C.diphtheriae* (зразок № 1, рН 7,2, та зразок № 2, рН 5,5) показало, що обидва зразки містять білок та ліпотейхоеві кислоти: у зразку № 1 концентрація білку складала 13,5 мг/мл, у зразку № 2 – 15,4 мг/мл. Вміст ліпотейхоевих кислот у зразку № 1 був 614,2 мкг/мл, у зразку № 2 – 548,2 мкг/мл.

При визначенні впливу досліджуваних зразків антигенних препаратів на адгезивні властивості тест-штаму *C.diphtheriae* в якості контролей були взяті 2 зразки фізіологічного розчину з рН 7,2 та 5,5, які використовувалися для приготування вихідних суспензій коринебактерій дифтерії. У першій серії дослідів визначалася дія експериментальних препаратів на активність адгезії при попередньому впливі антигенних препаратів на тест-культуру *C.diphtheriae*, у другій серії – через їх попередню адсорбцію на формалінізованих еритроцитах людини (табл. 2).

**Таблиця 2 – Адгезивні властивості тест-штаму *C.diphtheriae* під впливом експериментальних зразків антигенних препаратів за результатами двох серій дослідів**

№№	Досліджувані зразки	Перша серія дослідів			Друга серія дослідів		
		СПА	КА	ІАМ	СПА	КА	ІАМ
1	зразок № 1, рН 7,2	3,5	86±3,5	4,1	5,4	90±3,0	6,0
2	зразок № 2, рН 5,5	3,0	86±3,5	3,5	3,8	89±3,1	4,3
3	K1, рН 7,2	3,2	86±3,5	3,7	3,1	89±3,1	3,5
4	K2, рН 5,5	3,1	87±3,4	3,6	2,4	83±3,8	2,9

Як свідчать дані таблиці 2, найбільші показники адгезивності тест-штаму *C.diphtheriae* зареєстровано для зразку № 1 у другій серії дослідів, а саме: середній показник адгезії (СПА) – 5,4, індекс адгезивності мікроорганізмів (ІАМ) – 6,0, що відповідає високому рівню адгезивності. Ці показники перевищували аналогічні дані у контролі K1 на 42 %, що демонструє наявність стимулюючої дії досліджуваного бактеріального антигенного препарату на процеси адгезії тест-штаму ( $t>2$ ;  $p=0,05$ ). Зразок № 2 також підвищив рівень адгезивності тест-штаму у порівнянні з контролем K2, але у межах середнього рівню адгезивності: показники ІАМ та СПА збільшилися на 33 і 37 %, відповідно ( $t>2$ ;  $p=0,05$ ).

По даним першої серії дослідів очевидно, що різниця СПА та ІАМ для зразку № 1 по відношенню до відповідного контролю K1 була на рівні 9-10 %; щодо зразку № 2, то дослідний рівень не відрізнявся від контрольного K2 ( $t<2$ ;  $p=0,05$ ), тобто слабо кисле середовище нівелювало стимулюючу дію зразка № 1 на адгезивні властивості тест-штаму. Рівень СПА та ІАМ для зразку № 2, а також для K2 фактично не відрізнялися від показників адгезії у контролі K1, як у першій, так і у другій серії дослідів. Отже зниження рівню рН антигенного препарату визначило зменшення адгезивності тест-штаму *C.diphtheriae*. Щодо

**Таблиця 3 – Показники активності фагоцитозу тест-штаму *C.diphtheriae* під впливом антигенних препаратів *C.diphtheriae***

№ №	Досліджувані зразки антигенних препаратів	МЧ	ІФ	КФ, %	ФЧ
1	зразок № 1, рН 7,2	360±13,5	3,6	94,0±1,5	3,8
2	зразок № 2, рН 5,5	129±21,1	1,3	74,0±4,4	1,7
3	K1, рН 7,2	247±19,8	2,5	82,0±3,8	3,0
4	K2, рН 5,5	130±12,7	1,3	77,0±2,0	1,7

відсотку еритроцитів з адгезованими бактеріями (КА), в обох зразках та у контролі він статистично не відрізнявся ( $t<2$ ;  $p=0,05$ ).

У порівнянні з даними другої серії дослідів в першій серії показники адгезії для обох зразків виявилися суттєво меншими: для зразку № 1 – на 35 % (СПА) і 32 % (ІАМ), а для зразку № 2 ця різниця складала 21 % (СПА) і 19 % (ІАМ) ( $t>2$ ;  $p=0,05$ ). Одержані дані свідчать про те, що рівень адгезивності тест-штаму визначається не лише мікробними адгезинами, але й здатністю до адгезії еритроцитів.

Таким чином, досліджувані зразки антигенних препаратів *C.diphtheriae* підвищували адгезивність тест-штаму *C.diphtheriae* при попередній експозиції з формалінізованими еритроцитами людини, але при рН 7,2 процеси адгезії мікробних клітин *C.diphtheriae* відбувалися активніше, ніж при рН 5,5, при якому, вважається, ще не спостерігаються процеси коагуляції білку. Зниження рівню рН призводить, можливо, до інактивації молекулярних структур – як ПАМС еритроцитів, так і адгезинів коринебактерій.

Надалі проводилося вивчення впливу досліджуваних зразків антигенних препаратів (№ 1 і № 2) на фагоцитоз тест-штаму *C.diphtheriae* у кролячій крові; за контроль були також узяті зразки фізіологічного розчину з відповідними значеннями рН (табл. 3).

Як видно з таблиці 3, зразок № 1 бактеріального антигенного препарату *C.diphtheriae* володіє фагоцитоз-стимулюючими властивостями, оскільки усі показники активності фагоцитозу суттєво перевищували відповідні контрольні показники K1 ( $t>2$ ;  $p=0,05$ ). При цьому нейтрофіли активізувалися як у якісному (збільшення мікробного числа (МЧ) – числа фагоцитованих бактерій), так і у кількісному відношенні (збільшення коефіцієнту фагоцитозу (КФ) – відсотку фагоцитуючих нейтрофілів).

Дані таблиці 3 показали також істотну перевагу за рівнем показників фагоцитозу для зразку № 1 у порівнянні зі зразком № 2: відповідно, МЧ виявилось більшим у 2,8 рази, КФ – на 21 %, фагоцитарне число (ФЧ) – у 2,2 рази ( $t>2$ ;  $p=0,05$ ). Привертає увагу той факт, що показники активності фагоцитозу для зразку № 2 статистично не відрізнялися від показників у K2 ( $t<2$ ;  $p=0,05$ ), що може вказувати на порушення здатності нейтрофілів розпізнавати відповідні молекулярні структури патогену. В контролях спостерігалися такі ж само закономірності: МЧ K1 було у 1,9 рази більшим за МЧ K2, ФЧ K1 у 1,8 рази перевищувало ФЧ K2 ( $t>2$ ;  $p=0,05$ ). За значенням КФ показники статистично не відрізнялися, ( $t<2$ ;  $p=0,05$ ). Одержані дані вірогідно свідчать і про те, що навіть у слабо кислому середовищі молекулярні структури поверхне-

вих антигенів *C. diphtheriae* частково втрачають свою специфічність і здатність стимулювати механізми уродженого імунітету.

**Висновки.** Досліджувані зразки антигенних препаратів підвищують показники адгезії тест-штаму *C. diphtheriae*, але при рН 7,2 адгезивність мікробних клітин виявилася достовірно вищою за аналогічні показники при рН 5,5. Рівень рН бактеріального антигенного препарату суттєво впливає також на активність фагоцитозу *C. diphtheriae* – якщо при рН 7,2 спостерігається його стимулююча дія, то рН 5,5 нівелює властивість антигенного препарату активізувати

фагоцитарну активність нейтрофілів. Одержані дані вказують на важливість визначення оптимального значення рН у технологічному процесі одержання бактеріального антигенного препарату при конструюванні комбінованих дифтерійних вакцин.

**Перспективи подальших досліджень.** Оптимізація технології виготовлення експериментальної комплексної дифтерійної кандидат-вакцини з бактеріальним ад'ювантом за допомогою ультразвукової дезінтеграції культури *C. diphtheriae*, одержання експериментальних серій кандидат-вакцини для клінічних випробувань.

## Література

1. Open database: Data provided by Member States through WHO-UNICEF Joint Reporting Form and WHO Regional offices. WHO vaccine-preventable disease monitoring system, 2019 global summary. Available from: [https://www.who.int/immunization/monitoring\\_surveillance/data/gs\\_gloprofile.pdf?ua=1](https://www.who.int/immunization/monitoring_surveillance/data/gs_gloprofile.pdf?ua=1)
2. Open database: Incidence time series for Ukraine (UKR). Last updated 15-July-2019 (data as of 1-July-2019). Available from: WHO vaccine-preventable diseases: monitoring system. 2019 global summary. Available from: [http://apps.who.int/immunization\\_monitoring/globalsummary/incidences?c=UKR](http://apps.who.int/immunization_monitoring/globalsummary/incidences?c=UKR)
3. Open database: Coverage time series for Ukraine (UKR). Last updated 15-July-2019 (data as of 1-July-2019). Available from: WHO vaccine-preventable diseases: monitoring system. 2019 global summary. Available from: [http://apps.who.int/immunization\\_monitoring/globalsummary/coverages?c=UKR](http://apps.who.int/immunization_monitoring/globalsummary/coverages?c=UKR)
4. Open database: The immunological basis for immunization series: module 2: diphtheria. WHO Press. 2009. Available from: WHO Library Cataloguing-in-Publication Data. Available from: [https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/44094/9789241597869\\_eng.pdf?sequence=1](https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/44094/9789241597869_eng.pdf?sequence=1)
5. Chudnaia LM, Oksiyuk VH, Krasiuk LS, Moroz LV, Bryzhata SY, Skuratovskaia YM, et al. Epydemyolohycheskaia sytuatsiya po dyfteryy v Ukrayne. Epydemyolohiya y ynfektsyonnye bolezny. 1999;1:10-2. [in Russian].
6. Popkova SM, Shmeleva EA, Leshchuk SY. Ymmunytet y ekolohycheskye aspekty bakteryonosytelstva pry dyfteryy. Biulleten VSNTs SO RAMN. 2005;1(39):134-40. [in Russian].
7. Yelyseyeva I, Babych Eu, Kivva F. New approaches to development of diphtheria vaccine. Anti-colonization strategy for the development of a combined diphtheria vaccine with bacterial antigen component. Publishing House: LAP LAMBERT Academic Publishing; 2018.
8. Yelyseyeva IV, Babych YeM, Bilozerskyi VI, Zhdamarova LA, Kolpak SA. Doslidzhennia nespetsyfichnoi zakhysnoi dii antyhennykh preparativ *C. diphtheriae* ta *B. pertussis*, oderzhanykh za dopomohoiu fizychnykh faktoriv dezintehratsii. Materialy mizhnar. nauk.-prakt. konf. «Okhrona ta zakhyst zdorovia liudyny v umovakh sohodennia»; 2018 2-3 Lyst.; Kyiv, Ukraina. Kyiv; 2018. s. 50-4. [in Ukrainian].
9. Yelyseyeva IV, Babych YeM, Bilozerskyi VI, Zhdamarova LA, Kolpak SA. Poverkhnevi antyheny zbudnyka dyfterii, oderzhani za dopomohoiu fizychnykh chynnykiv, yak biolohichna platforma dlia rozrobky kombinovanoi dyferiinoi kandydat-vaktsyny. Visnyk problem biolohii i medytsyny. 2018;3(145):251-6. [in Ukrainian].
10. Babych YeM, Yelyseyeva IV, Bilozerskyi VI, Zhdamarova LA, Isaienko Olu, Bobryrieva IV, Horbach TV, vynakhidnyky; Derzhavna ustanova «Instytut mikrobiolohii ta imunolohii im. I. I. Mechnykova NAMN Ukrainy», pravonastupnyk. Sposib otrymannia dyferiinoho bakterialnoho antyheny: patent Ukrainy UA 86891. 2014 Sich. 10. [in Ukrainian].
11. van der Meer JW, Joosten LA, Riksen N, Netea MG. Trained immunity: A smart way to enhance innate immune defence. Mol Immunol. 2015 Nov;68(1):40-4. DOI: 10.1016/j.molimm.2015.06.019
12. Rappuoli R, Santoni A, Mantovani A. Vaccines: An achievement of civilization, a human right, our health insurance for the future. J Exp Med. 2019 Jan 7;216(1):7-9. DOI: 10.1084/jem.20182160
13. Seregina NV, Chestnova TV, Zherebczova VA, Khromushin VA. Obzor biofizycheskikh osobennostej mikrobnoy adgezii. Vestnik novi'kh medicynskikh tekhnologij. 2008;XV(3):175-7. [in Russian].
14. Hasty DL, Ofek I, Courtney HS, Doyle RJ. Multiple adhesins of streptococci. Infect Immun. 1992;60:2147-52.
15. Scott JR, Barnett TC. Surface proteins of gram-positive bacteria and how they get there. Annu Rev Microbiol. 2006;60:397-423.
16. Tauch A, Burkovski A. Molecular armory or niche factors: virulence determinants of *Corynebacterium* species. FEMS Microbiol Lett. 2015 Dec;362(23):fmv185.
17. Ott L. Adhesion properties of toxigenic corynebacteria. AIMS Microbiol. 2018;4(1):85-103. Published online 2018 Feb 9. DOI: 10.3934/microbiol.2018.1.85
18. Zemledelie [Internet]. Dostupno: <http://racechron.ru/pochva-i-mikroorganizmy/3677-zavisimost-adgezii-ot-sostava-sredy-chast-2.html> [in Russian].
19. Brylys VY, Brylyne TA, Lentsner KhP, Lentsner AA. Metodyka yzuchennia adhezyvnoho protsesa mykroorhanyzmov. Laboratornoe delo. 1986;4:210-2. [in Russian].
20. Yelyseyeva IV, Babych YeM, Bilozerskyi VI, Zhdamarova LA, Kolpak SA. Vplyv eksperymentalnykh bakterialnykh antyhennykh preparativ zbudnyka dyfterii, oderzhanykh za dopomohoiu fizychnykh chynnykiv, na adheziiu test-shtamiv *C. diphtheriae*. Visnyk problem biolohii i medytsyny. 2016;4,1(133):264-8. [in Ukrainian].
21. Mykroskopycheskaia tekhnika [Internet]. Metody yssledovannia fahotsytoza in vitro. Dostupno: [http://labx.narod.ru/documents/issledovanie\\_fagocitoza.html](http://labx.narod.ru/documents/issledovanie_fagocitoza.html) [in Russian].
22. Zajczew VM, Lifyandskij VG, Marinkin VI. Prikladnaya medicynskaya statistika: uchebnoe posobie. Sankt-Peterburg: OOO «Izdatel'stvo Foliant»; 2003. 428 s. [in Russian].

### ДО ПИТАННЯ РОЗРОБКИ КОМПЛЕКСНОЇ ДИФТЕРІЙНОЇ ВАКЦИНИ З БАКТЕРІАЛЬНИМ АД'ЮВАНТОМ

**Єлісеєва І. В., Бабич Є. М., Ждамарова Л. А., Білозерський В. І., Колпак С. А.**

**Резюме.** Стаття присвячена дослідженню впливу нативних антигенних комплексів збудника дифтерії, одержаних за допомогою ультразвукової дезінтеграції мікробних клітин у нейтральному та слабо кислому середовищі, на їх фагоцитоз-стимулюючу активність та адгезивні властивості тест-штаму *C. diphtheriae* для подальшого удосконалення технології виготовлення комплексної дифтерійної вакцини проти маніфестного прояву та персистуючих форм дифтерійної інфекції.

**Ключові слова:** дифтерійна вакцина, бактеріальний ад'ювант, адгезія, фагоцитоз.

## К ВОПРОСУ РАЗРАБОТКИ КОМПЛЕКСНОЙ ДИФТЕРИЙНОЙ ВАКЦИНЫ С БАКТЕРИАЛЬНЫМ АДЪЮВАНТОМ Елисеєва І. В., Бабич Е. М., Ждамарова Л. А., Белозерский В. И., Колпак С. А.

**Резюме.** Статья посвящена изучению влияния нативных антигенных комплексов возбудителя дифтерии, полученных при помощи ультразвуковой дезинтеграции микробных клеток в нейтральной и слабокислой среде, на их фагоцитоз-стимулирующую активность и адгезивные свойства тест-штамма *C. diphtheriae* для дальнейшего усовершенствования технологии производства комплексной дифтерийной вакцины против манифестного проявления и персистирующей формы дифтерийной инфекции.

**Ключевые слова:** дифтерийная вакцина, бактериальный адъювант, адгезия, фагоцитоз.

## TO THE DEVELOPMENT OF THE COMPLEX DIPHTHERIA VACCINE WITH BACTERIAL ADJUVANT Yeliseyeva I. V., Babich E. M., Zhdamarova L. A., Belozersky V. I., Kolpak S. A.

**Abstract.** The lessons of the great diphtheria epidemic in Eastern Europe in the 1990s and the increasing trend of diphtheria in the world over the past few years have forced the medical community not to forget about the threat of a diphtheria outbreak. Sporadic cases of disease in Ukraine over the last 10 years are just the tip of the iceberg, as the transmission of infection through bacterial carriers and latent forms of diphtheria unrestrained continues. An analysis of the number of cases of diphtheria registered in Ukraine since the late 1980s and the corresponding rates of vaccination coverage against diphtheria reveals a paradoxical phenomenon: a significant increase in the incidence since 1990 was accompanied by an annual increase in the percentage of population coverage of DTP3. The maximum number of diphtheria cases in 1994-1996 was accompanied by the highest – almost 100 % – rates of vaccination. Thus, the epidemic has not been stopped by increasing the number of vaccinated persons. For a number of years, in our laboratory are conducted the research on the development of a complex diphtheria vaccine with a bacterial component. The vaccine has not only a protective effect against diphtheria disease, but is also directed against the colonization of the respiratory tract by the pathogen and the sanitation of *C. diphtheriae* bacterial carriers. The development of bacterial adjuvant is carried out using ultrasonic disintegration of bacteria in line with two modern vaccine design strategies, namely: an anti-adhesive strategy that develops drugs that prevent colonization by the pathogen of the mucous membranes of the macroorganism and its subsequent invasion, as well as strategies for potentiation of the trained innate immunity, and to promote the elimination of the pathogen from the body in immunodeficiency states, which are associated with prolonged bacterial activity, and to enhance the immune protection of the body after vaccination. The development of bacterial adjuvant is in line with two modern vaccine design strategies, namely: (1) anti-adhesive strategy that implements drugs that prevent the pathogen colonization of the mucous membranes of the macroorganism and its subsequent invasion; (2) strategies for potentiation of trained innate immunity, which can protect against infection and promote the elimination of the pathogen in immunodeficiency states that are associated with prolonged bacterial activity, as well as the treatment of inverse immunotolerant states to enhance immune response. The experimental candidate vaccine has been preclinically tested in an enterprise setting. However, the study of the effect of experimental antigenic preparations on cell-mediated immunity is being continued and the technological process of manufacturing the experimental candidate vaccine is being worked out. It was established that the tested samples of *C. diphtheriae* antigenic preparations increased the adhesiveness of the *C. diphtheriae* test strain at previous exposure with formalinized human red blood cells, and also demonstrated phagocytosis-stimulating effect ( $t > 2$ ;  $p = 0.05$ ). The decrease in the indices of adhesion and phagocytosis of the test strain at pH=5.5, apparently indicates that even a weakly acidic environment damages the molecular structures – PAMS of erythrocytes and adhesines of corynebacteria, respectively – which partially lose their specificity and ability to stimulate mechanisms of innate immunity. The obtained data indicate the importance of determining the optimum pH value in the technological process of obtaining a bacterial antigenic preparation in the design of combined diphtheria vaccines.

**Key words:** diphtheria vaccine, bacterial adjuvant, adhesion, phagocytosis.

Рецензент – проф. Лобань Г. А.  
Стаття надійшла 29.08.2019 року

DOI 10.29254/2077-4214-2019-3-152-268-273

UDC 615.322:616.37

<sup>1</sup>Kryvtsova M. V., <sup>1</sup>Trush K., <sup>2</sup>Koščová J., <sup>2</sup>Eftimova J.

## ANTIMICROBIAL, ANTIOXIDANT AND SOME BIOCHEMICAL PROPERTIES OF *ARNICA MONTANA* L.

<sup>1</sup>Uzhhorod national university (Uzhhorod)

<sup>2</sup>University of Veterinary Medicine and pharmacy in Košice (Košice)

maryna.krivcova@gmail.com

**Publication relation to planned scientific research projects.** The present study is a fragment of the research project at the Department of Genetics, Plant Physiology and Microbiology of the Uzhhorod National University «Research of genetic, physiological and biochemical mechanisms of the various organization level biological

systems adaptation in the anthropogenic loading conditions», No. 0115U003902.

**Introduction.** In recent years, many researchers have focused on medicinal plants derived from natural products due to their wide range of pharmacological significance [1]. Moreover, natural resources of vegetable origin represent an important source of drugs in