

УДК 615.371+579.871.1

**ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНІ ПІДХОДИ ДО СТВОРЕННЯ ЕНТЕРАЛЬНИХ ФОРМ  
ПРОТИДИФТЕРІЙНИХ ПРЕПАРАТІВ****Білозерський В.І., Бабич Є.М., Волянський Ю.Л., Краснопольський Ю.М., Щетініна В.М.,  
Колоколова О.Б., Везуб Л.Г., Мартинов А.В., Ждамарова Л.А., Скляр Н.І., Чусшов В.І.  
Інститут мікробіології та імунології ім. І.І. Мечникова АМН України м. Харків**

Епідемія дифтерії, що спостерігалась в Україні та інших країнах СНД у 1991-2000 роках, а також те, що і на сьогодні захворюваність на дифтерію зберігається на досить високому рівні може свідчити про недостатню ефективність існуючих програм імунізації та бустерних імунізацій, що диктує необхідність пошуку оптимальних вакцинних препаратів, шляхів та схем їх введення.

Ідея непарентеральної імунізації, тобто введення вакцин природним шляхом, в тому числі per os, знаходить у наступний час все більш широке практичне втілення [1, 2, 3, 4]. В роботах, присвячених цьому питанню, наведені дані, що свідчать про низьку реактогенність пероральних вакцин та достатньо високу імуногенність таких препаратів [3, 4]. Стосовно специфічної профілактики дифтерії цей спосіб вакцинації приваблює більшою експресністю темпів створення довгострокового імунітету проти цієї інфекції. Крім того, за допомогою пероральної імунізації можна захистити осіб, в першу чергу дітей, з ускладненим алергологічним анамнезом.

Виходячи з цього, метою досліджень стала розробка експериментальних підходів створення імуногенних ентеральних форм вакцинних препаратів проти дифтерії та випробування різних схем імунізації ними.

**Матеріали і методи**

В роботі використовували препарати соматичних антигенів *Corynebacterium diphtheriae*, виділених із мікробної маси виробничого штаму Вейсензее фізіологічним розчином та 0,01% егілендіамінтетраацетатом (ЕДТА) за відомими методами [5]. Кількість білку в одержаних зразках визначали за Лоурі [6], вуглеводів – за Дюбуа [7], ліпідів – за Сван в модифікації Баумана [8], антигенний склад оцінювали в реакції преципітації за Оухтерлоні проти антидифтерійної сироватки [7].

Пероральні форми готували методами сорбції на цеолітах з включенням в гель альгінату кальцію та ліпосомах, виготовлених з фосфоліпідів жовтка яєць за схемою, приведеною на мал. 1.

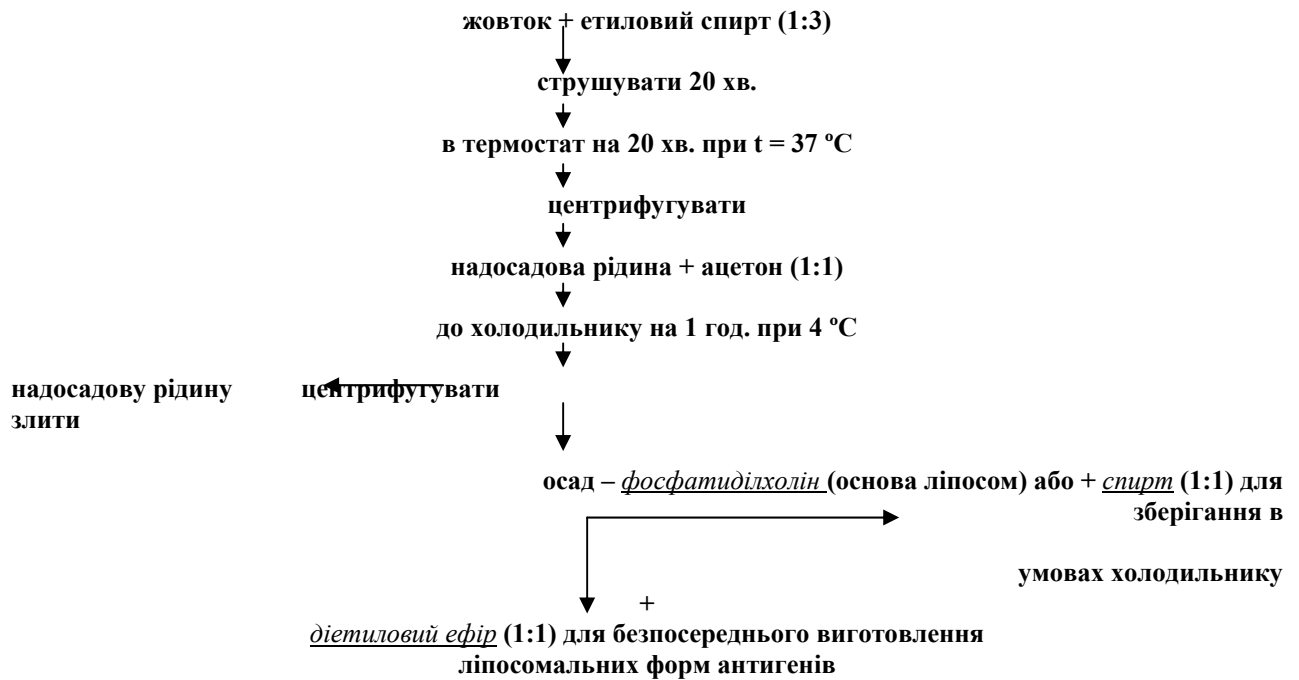
Дослідження проводились на кролях породи шин шила вагою 3-3,2 кг. Ефективність пероральної імунізації оцінювали в РПГА з дифтерійним комерційним діагностикумом. Титри протидифтерійних антитіл у сироватках крові імунізованих тварин визначали на 14, 28 день після закінчення кожної схеми введення антигену та перед початком ревакцинації.

Статистичну обробку результатів проводили за методом Стьюдента-Фішера [9].

**Результати досліджень**

Препарати соматичних антигенів, які використовувались для виготовлення експериментальних пероральних вакцин, містили у своєму складі переважно білкові речовини (табл. 1). Кількість вуглеводів відрізнялась у препаратів соматичних антигенів різних серій: у екстрактах фізіологічним розчином коливання цього показника були у діапазоні 6,9-36% складу, а у ЕДТА- екстрактах – 4,9-19%. Ліпіди складали незначну частину препаратів.

Всі зразки утворювали 1-3 лінії преципітації з антидифтерійною сироваткою.

1 етап: одержання фосфоліпиду для ліпосом

Ліпосомальну форму дифтерійного соматичного антигену одержували наступним чином:

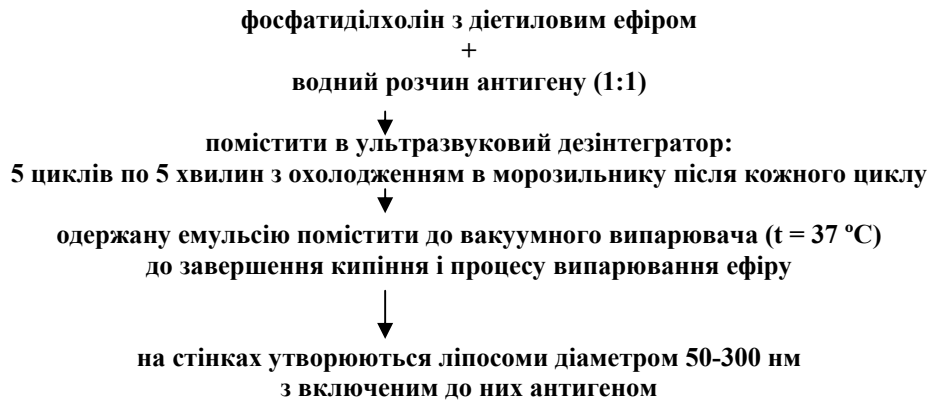
2 етап: одержання ліпосомальної форми дифтерійного антигену

Схема 1 – Одержання ліпосом та ліпосомальної форми дифтерійного соматичного антигену

Таблиця 1 – Хімічний склад соматичних антигенів, виділених з коринебактерій дифтерії

Серія	Екстракт фізіологічним розчином			Екстракт ЕДТА		
	Білок, мг/мл	Вуглеводи, мг/мл	Ліпіди, мг/мл	Білок, мг/мл	Вуглеводи, мг/мл	Ліпіди, мг/мл
1	5,1	2,9	0,03	8,2	1,72	0,09
2	16,0	1,2	0,13	8,3	0,44	0,105
3	7,65	3,95	0,06	8,0	1,88	0,05
4	9,2	1,12	0	7,7	1,22	0,01

Одержані препарати антигенів були використані для виготовлення пероральних форм вакцин-кандидатів, які створювали за допомогою різних полімерних сполук.

Імунізацію проводили шляхом введення тваринам *per os* вакцин-кандидатів, вміст антигену в яких становив 3,2 мг/мл; 6,1 мг/мл та 11,8 мг/мл. Імунізацію проводили циклами, тобто вакцинний препарат вводили тричі з інтервалом в 3 дні.

Стан гуморального імунітету вивчали на 14-й та 28-й день після закінчення циклів імунізації в реакції пасивної гемаглютинації (РПГА).

Було встановлено, що імуногенні властивості взятих в досліді антигенів залежали від природи сполук, які були використані для їх протикислотного захисту. Так, використання альгінату кальцію не виявило суттєвих переваг у порівнянні з цеолітним захистом антигенів відносно їх імуногенних властивостей.

Ліпосомальні форми досліджуваних антигенів мали перевагу перед вищезгаданими захисними покриттями. Так, продукція антитіл відносно антигенів, екстрагованих фізіологічним розчином та ЕДТА, була виявлена, на відміну від попередніх дослідів, у всіх перорально щеплених тварин. Тобто імуногенний ефект повторявся зі стовідсотковою частотою.

Отримані ентеральні форми кандидатів-вакцин були вивчені в плані можливостей їх протективної антитоксичної дії на розвиток кожних реакцій у відповідь на введення культури *Corynebacterium diphtheriae*. Для вирішення вищевказаної задачі щепленим тваринам на 3-й день після закінчення вакцинації ставили внутрішньошкірні проби по 0,02 мл в дозах 6; 4; 2,7; 1,8; 1,2; 0,8 та 0,5млн. мікробних клітин. Спостереження проводили через 3 доби протягом 10 днів по наявності припухлості, інфільтрату, некрозу.

Проведенні дослідів показали, що ентеральні вакцинні препарати суттєво відрізнялась по протективній дії. Так антиген, одержаний екстракцією ЕДТА, не проявляв протективних властивостей при цеолітному, альгінатному та ліпосомальному захисних покриттях.

В той час антиген, одержаний екстракцією фізіологічним розчином мав більш виражену захисну дію. Зокрема, це стосувалось ліпосомальних форм означених антигенів. Проведене ними щеплення дозволило знизити кількість летальних випадків у щеплених тварин та виявити шкірні реакції, що підтверджує наявність імуногенних властивостей у ентеральних форм даних антигенів.

В наступній серії дослідів були вивчені особливості формування гуморального імунітету при комбінованому щепленні—шляхом парентерального та ентерального введення антигенних сполук.

Спочатку проводили одноразове ін'єкційне щеплення (1мл з концентрацією антигену 0,01 мг/мл), а через 7 днів лабораторним тваринам перорально вводили трьохразово через кожні 72 години ентеральну форму дифтерійного антигена. Для щеплення були вибрані окремо концентрації зразків: 3,2 ; 6,1; та 11,8 мг/мл. На один прийом давали по 10 мл антигенної суспензії (таблиця 2).

Таблиця 2 – Титри гемаггютининів після парентеральної вакцинації та проведення ревакцинації пероральним шляхом.

Антиген	Концентрація антигену (в мг/мл)	Число тварин	Етап щеплення	Титри гемаггютининів			
				1:10	1:20	1:40	1:80 та >
Екстракт фізіологічним розчином	3,2	5	Вакцинація	1	1	0	0
			Ревакцинація	1	2	1	0
	6,1	5	Вакцинація	1	1	0	0
			Ревакцинація	0	1	2	2
	11,8	5	Вакцинація	1	1	1	0

			Ревакцинація	0	1	2	2
Екстракт ЕДТА	3,2	5	Вакцинація	2	0	0	0
			Ревакцинація	1	2	1	0
	6,1	5	Вакцинація	2	1	1	0
			Ревакцинація	0	1	2	2
	11,8	5	Вакцинація	2	2	1	0
			Ревакцинація	0	0	2	3

Проведене комбіноване щеплення показало, що пероральна вакцинація при введенні антигенів в концентрації 3,2 мг/мл, а в більшій мірі 6,1-11,8мг/мл достовірно підвищила рівень гуморального імунітету, який почав формуватись після ін'єкційного щеплення. Якщо порівняти з дозами та кратністю перорального антигенного стимулювання імунної системи тварин, то слід визнати, що комбіноване введення дозволяє отримати імуногенний ефект при значно менших концентраціях дослідних зразків. Як видно з приведених даних, сероконверсія антитіл спостерігалась, при включенні ін'єкційного шляху в загальну схему щеплення, починаючи з перорального введення антигену в дозі 3,2 мг/мл, тоді як використання лише непарентерального методу імунізації сприяло формуванню гуморального імунітету у тварин при введенні в 3 рази вищих концентрацій антигенів.

Узагальнення отриманих результатів дає підставу вважати, що найбільш виражені імуногенні властивості мали ліпосомальні форми антигенів при пероральному їх введенні. Про це свідчать дані вивчення гуморального імунітету на фоні проведення парентерального щеплення.

### Висновки

1. При порівнянні імуногенних властивостей соматичних антигенів, виділених з мікробних клітин *Corynebacterium diphtheriae* екстракцією фізіологічним розчином і ЕДТА, та захищених різними полімерними сполуками, при пероральному введенні експериментальним тваринам, були більш виражені при використанні їх у ліпосомальній формі.
2. Антигенні субстанції збудника дифтерії, які досліджувались, виявили найбільш виражені імуночинні властивості на фоні парентерального щеплення.
3. Виявлений стимулюючий ефект на антитілогенез при пероральному введенні препаратів соматичних антигенів після первинного парентерального щеплення свідчить про перспективність подальшого удосконалення схем щеплення ефективними дозами з встановленням оптимальних інтервалів між введеннями препарату.

### Перелік посилань

1. Алатырцева И.Е. Экспериментальные обоснования и иммунологические наблюдения по изучению интраназального метода ревакцинации против дифтерии, коклюша и столбняка // Автореф. дисс. ...докт. мед. наук.-Казань.-1969. – 27 с.
2. Воробьев А.А. Материалы к экспериментальному и теоретическому обоснованию проблемы пероральной иммунизации живыми вакцинами // Вакцины и сыворотки. - М., 1967.-Вып. 7.-С.3-27.
3. Воробьев А.А. Непарентеральные вакцины: принципы конструирования и эффективность // Журн. микробиол.-1998.-№1.-С.97-100.

4. Захарова Н.С., Григоренко А.В., Брицина М.В., Грошев А.Г. и др. Иммунологическая активность комбинированного коклюшно-дифтерийно-столбнячного препарата при энтеральной вакцинации животных // Журн. микробиол., 1981. - N 9. – С. 115-116.
5. Экспериментальная микробиология / под ред. С. Бырдарова. – София: Медицина и физкультура, 1965. – 465 с.
6. Loury O.H., Rosenbrough N.J., Farr A.Z., Randall R.J. Protein measurement with Folin phenol reagent // J. Biol. Chem. – 1951. – Vol.193, №1. – P. 265-276.
7. Щетініна В.М., Маніна Ж.М., Колоколова О.Б., Везуб Л.Г. Характеристика антигенного складу клітин та біологічних властивостей *Corynebacterium diphtheriae* // Дитячі інфекції. – 2000. – В.27. – С.24-33.
8. Бауман Л.К. Определение общих липидов в сыворотке крови // Лаб. дело. – 1961. - №11. – С.30-32.
9. Рокицкий П.Ф. Биологическая статистика / Минск: Вышэйная школа, 1973. – 319 с.

#### УДК 615.371+579.871.1

#### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ПОДХОДЫ К СОЗДАНИЮ ЭНТЕРАЛЬНЫХ ФОРМ ПРОТИДИФТЕРИЙНЫХ ПРЕПАРАТОВ

**Белозерский В.И., Бабич Е.М., Волянский Ю.Л., Краснопольский Ю.М., Щетинина В.М., Колоколова О.Б., Везуб Л.Г., Мартынов А.В., Ждамарова Л.А., Скляр Н.И., Чуешов В.И.**

**Институт микробиологии и иммунологии им. И.И. Мечникова АМН Украины**

Представлены данные по изучению иммуногенных свойств соматических антигенов *Corynebacterium diphtheriae*, защищенных различными полимерными соединениями при разных методах аппликации. Показана более выраженная иммуногенность липосомальных форм антигена при введении экспериментальным животным *per os* на фоне предварительного инъекционного введения этого препарата. Дается заключение о перспективности усовершенствования схем иммунизации с использованием эффективных доз и оптимальных интервалов между введением препаратов.

Ключевые слова: липосомальная и модифицированная формы антигенов, *Corynebacterium diphtheriae*, ревакцинация, грунд-иммунизация, гуморальный иммунитет, антитела.

#### UDC 615.371+579.871.1

#### EXPERIMENTAL APPROACHES TO CREATION OF ENTERAL FORMS OF ANTIDIPHTHERITIC PREPARATIONS

**Belozersky V.I., Babich E.M., Volansky Y.L., Krasnopolsky Y.M., Chetinina V.M., Kolokolova O.B., Verezub L.G., Martinov A.V., Zhdamarova L.A., Sklar N.I., Chuyeshov V.I.**

**Mechnikov Institute of Microbiology and Immunology AMS of Ukraine**

The data of study of immogenic properties of somatic antigens of *Corynebacterium diphtheria* protected by different polymer combinations at different methods of application are presented. More expressed immunogenicity of liposomal forms of antigen at introduction *per os* to experimental animals at background of preliminary parenteral introduction of this preparation is demonstrated. The conclusion about the perspective of improvement of immunization schemes with utilization of effective doses and optimal intervals between the introduction of preparations.

Key words: liposomal and modified forms of antigens; *Corynebacterium diphtheriae*, revaccination, ground-immunity, humoral immunity, antibodies.

#### УДК 615.371+579.871.1

#### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНІ ПІДХОДИ ДО СТВОРЕННЯ ЕНТЕРАЛЬНИХ ФОРМ ПРОТИДИФТЕРІЙНИХ ПРЕПАРАТІВ

**Білозерський В.І., Бабич Є.М., Волянський Ю.Л., Краснопольський Ю.М., Щетініна В.М., Колоколова О.Б., Везуб Л.Г., Мартинов А.В., Ждамарова Л.А., Скляр Н.І., Чуешов В.І.**

**Інститут мікробіології та імунології ім. І.І. Мечникова АМН України**

Представлені дані стосовно вивчення імуногенних властивостей соматичних антигенів *Corynebacterium diphtheria*, захищених різними полімерними сполуками при різних методах аплікації. Показана більш виражена імуногенність ліпосомальних форм антигену при введенні експериментальним тваринам *per os* на тлі первинного ін'єкційного введення цього препарату. Дається висновок стосовно перспективності удосконалення схем імунізації з використанням ефективних доз та оптимальних інтервалів між введенням препаратів.

Ключові слова: ліпосомальна та модифікована форми антигенів, *Corynebacterium diphtheriae*, ревакцинація, грунд-імунізація, гуморальний імунітет, антитіла.