



УДК 636.09:(615.015.11+615.371):616-072.5:636.92

В.О. ПОСТОЄНКО, докт. вет. наук, заст. директора

О.С. ВОЙТА, аспірант

І.М. МАНДЗЯ, наук. співробітник

Державний науково-контрольний інститут біотехнології і штамів мікроорганізмів, Київ

ОБҐРУНТУВАННЯ БІОХІМІЧНИХ ПОКАЗНИКІВ ВИЗНАЧЕННЯ НЕШКІДЛИВОСТІ ХІМІЧНИХ КОМПОНЕНТІВ У СКЛАДІ ВАКЦИН



Досліджено вплив формальдегіду й тіомерсалу у складі інактивованих вакцин на біохімічні показники крові кролів. Встановлено взаємозв'язок між вмістом хімічних компонентів у складі вакцин та зміною концентрацій малонового діальдегіду (МДА) у крові зазначених тварин і антиоксидантної активності (АОА) плазми. Обґрунтовано використання в майбутніх дослідженнях показників МДА та АОА плазми як додаткових критеріїв оцінки якості інактивованих вакцин для визначення порогових значень нешкідливості хімічних сполук у їх складі як на стадії розроблення нових препаратів, так і при їх практичному застосуванні.

Серед ветеринарних імунобіологічних засобів близько 32 % – інактивовані вакцини. Загальновідомо, що до складу таких вакцин, окрім антигену, входять різні хімічні сполуки, як-от:

- консерванти, які попереджують бактеріальну й грибову контамінацію (тіомерсал, фенол, 2-феноксіетанол);
- ад'юванти, що підсилюють антигенспецифічну імунну відповідь (алюмінію гідроксид, алюмокалієві галуни, ланолін, вазелінове масло);
- залишки речовин, які використовуються під час виробничого процесу, наприклад, інактиванти (формальдегід, бета-пропіолактон, аміноетиленімін, перекис водню) [13].

Сьогодні якість інактивованих вакцин контролюють за такими показниками, як стерильність, імуногенна й антигенна активність, повнота інактивації, вміст інактивантів, консервантів та ад'ювантів тощо [5]. Однак питання впливу окремих компонентів у їх складі на організм людини й тварин залишається малодослідженим [1, 7, 8]. Ведеться дискусія щодо застосування хімічних сполук під час виробництва вакцин. Дехто з авторів стверджує, що через їх незначну концентрацію хімічні сполуки не впливають на живий ор-

ганізм, а дехто описує патологічні реакції організму за їх дії у складі вакцин [9–15, 17, 18].

Тому обґрунтування додаткових критеріїв оцінки якості інактивованих вакцинних препаратів є одним із сучасних напрямів розвитку системи контролю й нагляду за їх якістю.

Аналітичні дослідження засвідчують, що більшість інактивованих вакцин у своєму складі містять формальдегід (67,7%) і тіомерсал (23%) [7].

Мета роботи – вивчити вплив формальдегіду та тіомерсалу в складі інактивованих вакцин на організм тварин і обґрунтувати додаткові критерії визначення порогових значень їх нешкідливості.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

Раніше нами було виготовлено модельний набір інактивованих вакцин проти пастерельозу кролів з різним вмістом формальдегіду (від 0 до 0,3 %) та тіомерсалу (від 0,005 до 0,02 %) [7]. Цей набір препаратів було використано для створення експериментальних моделей з визначення впливу формальдегіду й тіомерсалу в складі інактивованих вакцин на універсальні показники, які характеризують відповідь організму на

дію стрес-чинників. До таких належать вміст формених елементів крові, рівень продуктів перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ) та стан антиоксидантної системи захисту організму. За принципом аналогів було сформовано 9 груп по 5 сірих лабораторних кролів двомісячного віку в кожній. Тварини перебували в однакових умовах годівлі й утримання.

Дев'ять груп кролів було щеплено таким чином:

- група К слугувала контролем; тварин не щепили вакцинами, лише вводили підшкірно 1 см³ фізіологічного розчину;
- група 1 – вакциною без формальдегіду й тіомерсалу;
- група 2 – вакциною з вмістом формальдегіду 0,025 %;
- група 3 – вакциною з вмістом формальдегіду 0,05 %;
- група 4 – вакциною з вмістом формальдегіду 0,1 %;
- група 5 – вакциною з вмістом формальдегіду 0,3 %;
- група 6 – вакциною з вмістом формальдегіду 0,05 % і тіомерсалу 0,005 %;
- група 7 – вакциною з вмістом формальдегіду 0,05 % та тіомерсалу 0,01 %;
- група 8 – вакциною з вмістом формальдегіду 0,05 % і тіомерсалу 0,02 %.

Вакцину вводили тваринам підшкірно по 1 см³. На 21-шу добу після щеплення робили ревакцинацію.

Кров відбирали з крайової вени вуха до щеплення та на 3-тю, 10-ту, 17-ту, 24-ту, 31-шу, 38-му і 52-гу добу після щеплення.

Серед продуктів перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ) визначали рівень гідроперекисів ліпідів (ГПЛ) та малоно-

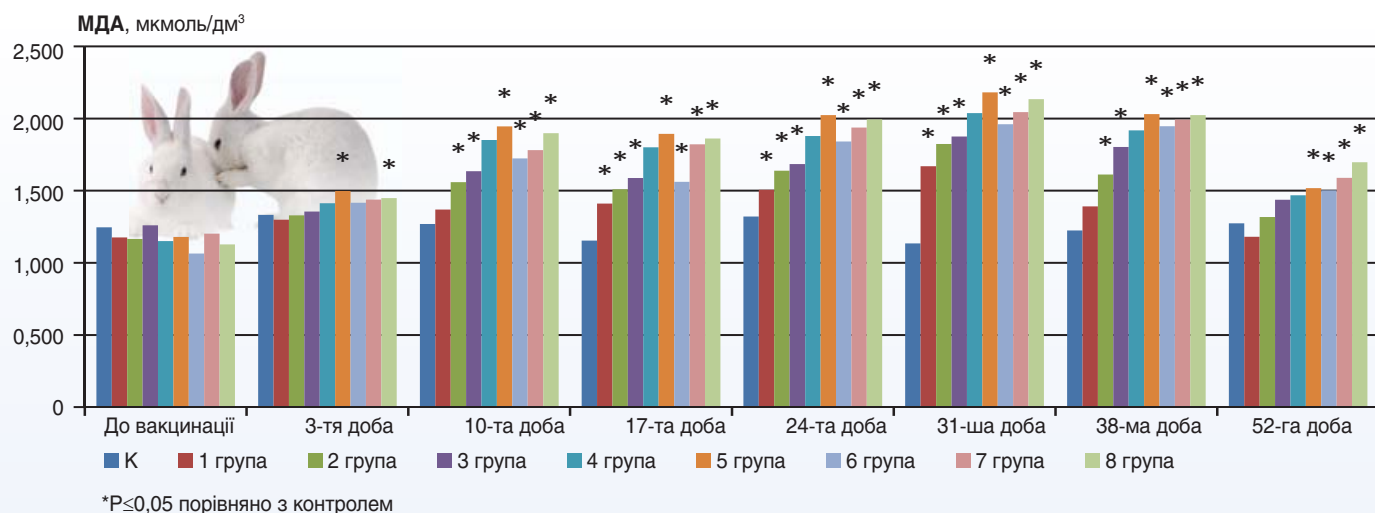


Рис. 1. Вплив формальдегіду та тіомерсалу у складі вакцини на рівень МДА крові кролів

вого діальдегіду (МДА) як первинних і кінцевих продуктів цього процесу відповідно. Як показник стану антиоксидантної системи захисту організму визначали рівень антиокиснювальної активності (АОА) плазми крові [3].

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Упродовж експериментального дослідження визначали рівень ГПЛ, МДА та АОА.

Аналіз рівня ГПЛ засвідчив, що він значно підвищився після щеплення й ревакцинації в дослідних групах порівняно з контрольною, проте не завжди залежав від концентрації хімічних компонентів. Це пояснюється тим, що ГПЛ є первинними нестійкими продуктами реакцій ПОЛ. Тому рівень ГПЛ не може слугувати критерієм оцінки нешкідливості хімічних компонентів у складі ветеринарних імунобіологічних засобів (ВІЗ).

МДА – це кінцевий продукт ПОЛ [2]. Зростання рівня МДА свідчить про інтенсифікацію процесів ПОЛ в організмі, внаслідок чого утворюється підвищена кількість токсичних сполук, вільних радикалів, які згубно впливають на мембрани клітин.

Протягом усього експерименту рівень малонового діальдегіду контрольної групи, а також усіх дослідних груп до щеплення був у межах $1,06\text{--}1,33$ мкмоль/дм³ (рис. 1).

Рівень МДА групи 1 незначно пере-

вищив норму на 10-ту добу після щеплення, а найбільшого рівня досяг на 31-шу ($1,67 \pm 0,041$). До норми рівень МДА в групі 1 повернувся на 52-гу добу.

У групах 2–5 він мав чітку пропорційну залежність від концентрації формальдегіду. Значення груп 3–5 були вищими від норми вже на 3-тю добу після щеплення й не повернулися до норми навіть на 52-гу добу. Найвищим рівень МДА впродовж усього дослідження був у групі 5 (з концентрацією формальдегіду 0,3 %).

Рівень МДА в групах 6–8 піднявся вище за норму на 3-тю добу після щеплення, був значно вищим за рівень МДА в групі 3 (з аналогічним вмістом формальдегіду 0,05 %) упродовж усього експерименту. На 52-гу добу після щеплення рівень МДА до норми не повернувся.

На 52-гу добу рівень МДА був найвищим у групах 5–8 і становив $1,5180 \pm 0,026$, $1,5026 \pm 0,017$, $1,5886 \pm 0,025$ і $1,6974 \pm 0,028$ відповідно.

Простежується чітка залежність рівня МДА від концентрації формальдегіду в складі ВІЗ. Чим вища концентрація формальдегіду, тим більші значення МДА протягом усього досліджуваного періоду. Було очевидним його значне збільшення на 10-ту добу після щеплення в усіх дослідних групах, а найбільших значень рівень МДА досяг на 10-ту добу після ревакцинації і до норми повернувся лише в дослідних групах 2 і 3. Встановлено, що підви-

щення рівня МДА в крові всіх дослідних груп кролів пропорційно залежить від концентрації формальдегіду в складі вакцин.

При дослідженні спільної дії формальдегіду (0,05 %) й тіомерсалу (0,005 %, 0,01 % та 0,02 %) відповідно в групах 6, 7 і 8 відзначено значно вищий рівень МДА порівняно з вакциною з аналогічним вмістом лише формальдегіду (0,05 %) протягом усього дослідження. З 17-ї доби після щеплення рівень МДА груп 7 і 8 стає вищим за рівень групи 4 (вміст формальдегіду 0,1 %). На 52-ту добу значення МДА груп 7 і 8 набагато вищі за значення групи 5 (вміст формальдегіду 0,3 %), а групи 6 – за рівень МДА групи 4. Це свідчить про довший час відновлення організму, зниження активності процесів ПОЛ, утворення вільних радикалів після комплексної дії формальдегіду й тіомерсалу в складі вакцин порівняно з введенням лише антигену чи набагато більшими концентраціями лише формальдегіду. Слід також зазначити, що збільшення рівня МДА впродовж усього експерименту в зазначених групах було пропорційне концентрації тіомерсалу.

Оскільки простежується чітка залежність змін рівня МДА від концентрації й хімічних компонентів, цей показник можна рекомендувати як додатковий критерій визначення нешкідливості для організму тварин хімічних компонентів у складі інактивованих вакцин.

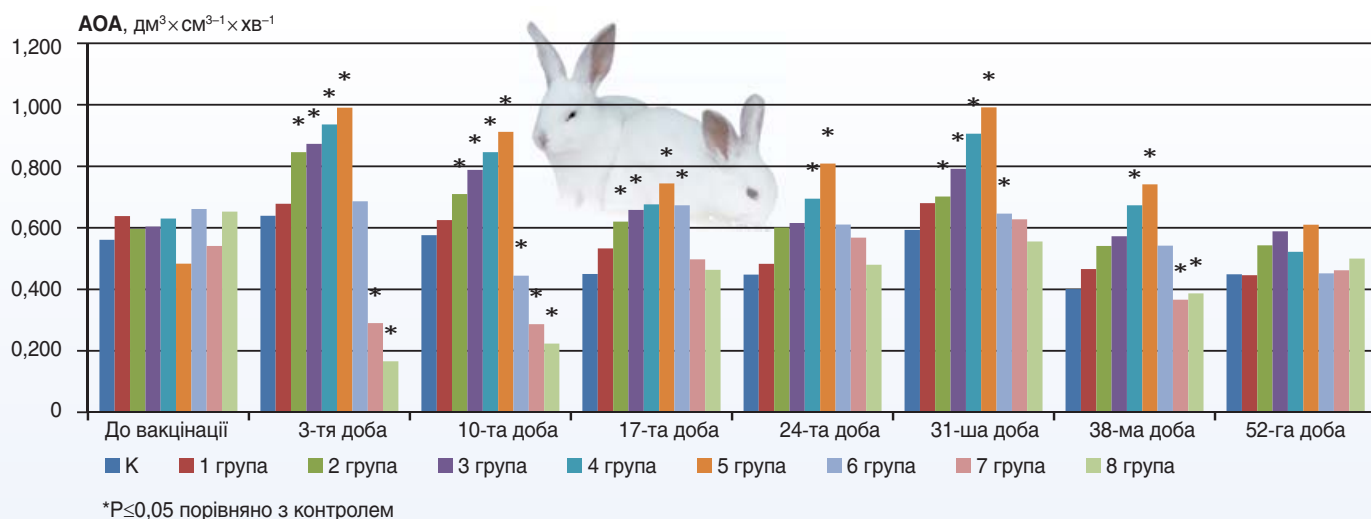


Рис. 2. Вплив формальдегіду й тіомерсалу в складі вакцини на рівень АОА плазми крові кролів

Антиоксидантна активність – це комплексний показник системи захисту організму, обумовлений наявністю в ньому низькомолекулярних антиокиснювачів, ферментних систем знешкодження й детоксикації продуктів ПОЛ. Вона зменшує ланцюгове утворення вільних радикалів і токсичний вплив надлишку продуктів вільнорадикального окиснення на організм [2]. Дослідниками [4] було доведено, що при гострих запальних процесах в організмі АОА плазми крові значно підвищується, що призводить до зниження окиснення ліпідів плазми крові. При тривалому розвитку хронічних процесів відбувається виснаження системи антиокиснювального захисту, при цьому значення АОА знижуються нижче норми.

Упродовж усього експерименту рівень антиоксидантної активності плазми крові контрольної групи, а також усіх дослідних груп до щеплення був у межах від 0,401 до 0,661 (рис. 2).

Показники дослідної групи 1 упродовж усього експерименту перебувають у межах норми, лише на 3-тю й 31-шу добу після щеплення незначно підвищуються.

Значення АОА в групах 2–5 значно перевищують норму вже на 3-тю добу після щеплення, мають чітку пропорційність між збільшенням рівня АОА плазми й концентрацією формальдегіду до 38-ї доби після щеплення. Рівень АОА груп 2 і 3 повертається

до норми на 38-му добу, а груп 4 і 5 – на 52-гу.

Значення АОА групи 6 на 3-тю й 17-ту добу після щеплення незначно підвищується вище норми, в інші дні коливається в її межах. Рівень АОА груп 7 і 8 значно знижується нижче норми на 3-тю, 10-ту й 38-му добу після щеплення. В інші дослідні дні значення АОА коливається в межах норми.

Проаналізувавши експериментальні дані рис. 2, простежуємо чітку залежність збільшення АОА плазми крові від концентрації формальдегіду в складі ВІЗ. Чим більша концентрація формальдегіду, тим більше підвищується АОА плазми, а отже, більшого навантаження зазнає антиоксидантна система захисту організму. Це пояснюється тим, що при підвищенні рівня продуктів ПОЛ (наприклад, МДА) спрацьовує система антиоксидантного захисту, АОА плазми крові підвищується. Збільшення навантаження на антиоксидантну систему захисту свідчить про те, що організм зазнає більшого стрес-впливу [16].

Аналізуючи дію ВІЗ з одночасним вмістом формальдегіду й тіомерсалу на АОА, слід зазначити, що цей показник у групі 6 (формальдегід 0,05 % + тіомерсал 0,005 %) значно нижчий упродовж усього експерименту порівняно з групою 3. Більше того, як було зазначено раніше, рівень МДА в групі 6 значно вищий порівняно з групою 3 упродовж усього експерименту. Це свідчить про

супресивний спільний вплив формальдегіду з тіомерсалом (навіть у концентрації 0,005 %) на систему антиоксидантного захисту організму.

Цікавим є рівень АОА в групах 7 і 8 (формальдегід 0,05 % + тіомерсал 0,01 % і 0,02 % відповідно). На 3-тю та 10-ту добу після щеплення він падає набагато нижче від показників контрольної й усіх інших дослідних груп. Надалі рівень АОА підвищується, але не досягає значень вище норми, що ми спостерігаємо в групі 3 (лише формальдегід 0,05 %). Отже, очевидним є значний супресивний вплив тіомерсалу в концентраціях 0,01–0,02 % у поєднанні з формальдегідом 0,05 % на антиоксидантну систему захисту організму. Одночасно простежується характерний високий рівень МДА в зазначених групах, а на 52-гу добу після щеплення він найвищий з-поміж усіх інших груп, що підтверджує високу інтенсивність процесів ПОЛ в організмі, їх довготривалу дію й супресію антиоксидантного захисту організму.

Оскільки залежно від концентрації хімічних компонентів спостерігається динаміка змін рівня АОА, його також можна рекомендувати як критерій визначення нешкідливості хімічних компонентів у складі інактивованих вакцин.

ВИСНОВКИ

1. Визначено чітку залежність між змінами показників МДА й АОА плазми щеплених інактивованими вакци-



нами кролів та концентрацією формальдегіду й формальдегіду і тіомерсалу в складі цих вакцин.

2. Обґрунтовано використання показників МДА й АОА як додаткових критеріїв визначення нешкідливості для організму тварин хімічних компонентів у складі інактивованих вакцин на стадіях розроблення нових препаратів, їх доклінічного випробування й контролю якості.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. **Войта О.С.** Вплив формальдегіду на організм людини та тварин [Текст] / О.С. Войта // Ветеринарна біотехнологія. – 2010. – № 17. – С. 46–51.
2. **Журавлев А.И.** Развитие идей Б.Н. Тарусова о роли цепных процессов в биологии [текст] / А.И. Журавлев // Биоантиокислители в регуляции метаболизма в норме и патологии. – М.: Наука, 1982. – С. 22.
3. **Методи** оцінки інтенсивності перекисного окиснення ліпідів та його регуляції у біологічних об'єктах: Методичні рекомендації [Текст] / Б.Т. Стегній, Л.В. Коваленко, М.Є. Романько та ін. – Харків, 2009. – 64 с.
4. **Оценка** антиокислительной активности плазмы крови с применением желточных липопротеидов [Текст] / Г.И. Клебанов, И.В. Бабенкова, Ю.О. Теселкин и др. // Лабораторное дело. – 1988. – № 5. – С. 61.



5. **Перелік** показників якості для ветеринарних імунобіологічних засобів [Текст] / В.О. Ушкалов, В.В. Чумаченко, В.О. Постоєнко та ін. // Методичні рекомендації. – К.: ДНКІБШМ, 2011. – С. 4.
6. **Постоєнко В.О.** Додаткові критерії оцінки стрес-впливу моно- і полівалентних вакцин на організм тварин (методичні рекомендації) [Текст] / В.О. Постоєнко, М.С. Карпуленко, В.В. Чумаченко та ін. – К.: ДНКІБШМ, 2011. – 24 с.
7. **Постоєнко В.О.** Технологія виготовлення модельних зразків вакцин з різним вмістом формальдегіду та тіомерсалу [Текст] / В.О. Постоєнко, О.С. Войта // Ветеринарна біотехнологія. – 2012. – № 20. – С. 134–141.
8. **Червонская Г.П.** Вакцинопрофилактика и права человека. Мифы и правда о прививках [Электронный ресурс] / Г.П. Червонская. – Способ доступа: <http://www.homeoint.org/kotok/vaccines/rnkb/truth4.htm>.
9. **Clements C.J.** The global impact of vaccines containing aluminium adjuvants / C.J. Clements, E. Griffiths // Vaccine. – 2002. – Vol. 20. – Suppl. 3. – P. 24–33.
10. **Comparison** of thiomersal-free and thiomersal-containing formulations of a recombinant hepatitis B vaccine (Hepavax-Gene) in healthy adults [Text] / I. Rebedae, I.G. Diaconescu, D. Bach [et al.] // Vaccine. – 2006. – Vol. 24. – P. 5320–5326.
11. **Effects** on the safety and immunogenicity of the chiron influenza vaccines AGRIPPAL and FLUAD [Text] / D. Toneatto, R. Bugarini, B. Corbellini [et al.] // International Congress Series. – 2004. – Vol. 1263. – P. 457–460.
12. **Heidary N.** Hypersensitivity Reactions to Vaccine Components [Text] / N. Heidary, D.E. Cohen // Dermatitis. – Vol. 16. – Suppl. 3. – 2005. – P. 115–120.
13. **Offit P.A.** Addressing Parents' Concerns: Do Vaccines Contain Harmful Preservatives, Adjuvants, Additives, or Residuals? [Text] / P.A. Offit, R.K. Jew // Pediatrics. – 2003. – Vol. 112. – P. 1394–1397.
14. **O'Hagan D.T.** The safety of vaccines [Text] / D.T. O'Hagan, R. Rappuoli // Research focus. – Vol. 9. – Suppl. 19. – 2004. – P. 846–854.
15. **Plotkin S.A.** Lessons learned concerning vaccine safety [Text] / S.A. Plotkin // Vaccine. – 2002. – Vol. 20. – Suppl. 1. – P. 16–19.
16. **Role** of antioxidant stress in the adult respiratory distress syndrome: evaluation of a novel antioxidant strategy in porcine model of endo-

toxin – induced acute lung injury [Text] / P.K. Gonzales, J. Zhuang, S.R. Doctrow, et al. // Shock (United States). – 1996. – Vol. 6. – Suppl. 1. – P. 23–26.

17. **Stubgen J.-P.** Neuromuscular disorders associated with Hepatitis B vaccination [Text] / J.-P. Stubgen // Journal of Neurological Sciences. – 2010. – Vol. 292. – P. 1–4.
18. **Young H.A.** Thimerosal exposure in infants and neurodevelopmental disorders: An assessment of computerized medical records in the Vaccine Safety Datalink [Text] / H.A. Young, D.A. Geier, M.R. Geier // Journal of Neurological Sciences. – 2008. – Vol. 271. – P. 110–118.

Одержано 21.02.2013

Обоснование биохимических показателей определения безвредности химических компонентов в составе вакцин. В.А. Постоєнко, О.С. Войта, И.Н. Мандзя

Исследовано влияние формальдегида и тиомерсала в составе инактивированных вакцин на биохимические показатели крови кролей. Установлена взаимосвязь между концентрациями химических компонентов в составе ветеринарных иммунобиологических препаратов и изменениями уровня малондиальдегида (МДА) в крови кролей и антиоксидантной активности (АОА) плазмы. Обосновано использование в последующих исследованиях показателей уровня МДА и АОА плазмы в качестве дополнительных критериев оценки качества инактивированных вакцин для определения пороговых значений безвредности химических соединений в их составе как на стадии разработки новых препаратов, так и при их практическом применении.

Substantiation of biochemical indices for determination of harmless of vaccines chemical compounds. V.O. Postoienco, O.S. Voita, I.M. Mandzia

There was investigated influence of formaldehyde and thimerosal in vaccines on the biochemical blood indices. For investigations used such biochemical indices as malondialdehyde (MDA), hydroperoxidation of lipids (HPL) and antioxidant activity (AOA) of blood plasma. It was shown correlation between chemical compounds in vaccines and changes of MDA and AOA levels. MDA and AOA are recommended for determination of harmless of chemical compounds in inactivating vaccines. ☉