

Вивчення безпечності очищених антигенних фракцій збудника дифтерії, отриманих за допомогою фізичних чинників

Є.М.Бабич, І.В.Єлисеєва, Л.А.Ждамарова, В.І.Білозерський, І.В.Бобирєва

ДУ «ІМІ мікробіології та імунології ім. І.І.Мечникова АМН України»,
лабораторія специфічної профілактики краплинних інфекцій
Харків, Україна

Досліджено безпечність очищених антигенних препаратів, отриманих з виробничого штаму *Corynebacterium diphtheriae* var. *gravis* токсигенний, massachusetts за допомогою ультразвукової дезінтеграції з подальшим ультрацентрифугуванням та препаративною гель-хроматографією, в експериментах *in vitro* (визначення показників пошкодження нейтрофілів) і на лабораторних тваринах (визначення циркулюючих імунних комплексів, дермонекротична дія). Усі антигенні фракції, за виключенням фракцій з молекулярною масою 6000-7000 дальтон, які продемонстрували підвищений рівень показників пошкодження нейтрофілів у порівнянні з контролем ($t > 2$), а також обумовили розвиток запальних інфільтратів при підшкірному їх введенні підслідним тваринам, виявилися не реактогенними.

Ключові слова: збудник дифтерії, антигенні фракції, ультразвукова дезінтеграція, препаративна гель-хроматографія, безпечність, показники пошкодження нейтрофілів, циркулюючі імунні комплекси, дермонекротична дія.

ВСТУП

Вакцинація проти інфекційних захворювань на сьогоднішній день характеризується неухильним збільшенням кількості вакцинних препаратів, що включені до календаря обов'язкових щеплень, та розширенням арсеналу профілактичних засобів за рахунок нових комплексних вакцин, до складу яких входять від трьох до шести антигенних компонентів різ-

них збудників захворювання, наслідком чого явилось зростання антигенного навантаження на організм вакцинованих. На тлі ймовірного формування слідової сенсibiliзації макроорганізму часто розвивається неспецифічна алергія до таких гетерогенних антигенів, як пилок рослин, домашній пилок, а також до найбільш численних алергенів мікробного походження [10]. Введення профілактичного препарату може стати провокуючим фактором різних побічних реакцій, зокрема загострення хронічних захворювань [19, 20].

У сучасних умовах, коли алергічні захворювання вважаються загальною проблемою, особливо актуальним є вирішення питання про проведення вакцинації дітей з алергічними проявами, які складають численну групу ризику [2, 9, 13].

Для зниження реактогенності вакцин зусилля вчених спрямовані на приготування високоочищених антигенів [10]. Проте очищені гомогенні клітинні компоненти патогенів мають зменшену імуногенну активність, що обумовлює необхідність застосування ад'ювантів, неспецифічно підсилюючих протективний ефект.

Дослідження відносно можливості зменшення доз найбільш реактогенних препаратів у схемах щеплення виявилось малопродуктивним. У низьких концентраціях препарати не визивають побічних реакцій й одночасно не забезпечують формування напруженого імунітету [3]. Тому зменшення вакцинальних доз може здійснюватися також тільки в поєднанні із застосуванням ад'ювантів [9].

За останні десять-п'ятнадцять років було розроблено і клінічно оцінено велику кількість ад'ювантів, серед яких емульсії на масляній основі (MF 59 і Montanide ISA 720), імуностимулятори (монофосфатний ліпід А, CpG олі-

гонуклеотиди), сапоніни (QS21), мукозальні ад'юванти, розроблені на основі бактеріальних екзотоксинів для назального та перорального застосування. На нараді Комітету ВООЗ по безпечності вакцин, що відбулася в липні 2004 р., підкреслювалось, що оскільки ад'юванти володіють власними фармакологічними властивостями, котрі можуть впливати на імуногенність і безпечність вакцин, оцінка їх безпечності є істотним фактором. На даний момент не існує визнаних моделей з використанням лабораторних тварин для тестування безпечності ад'ювантів, хоча їх необхідність є очевидною. Традиційні дослідження безпечності на основі поступового нарощування дози також не можуть дати достовірних результатів відносно імунологічних аспектів безпечності (включно толерантність, ефективність, гіперчутливість і розвиток аутоімунних процесів) [18].

Доступними та інформативними тестами вивчення сенсibiliзуючої дії антигенів є визначення рівня циркулюючих імунних комплексів (ЦІК), дермонекротичної реактивності та показників пошкодження нейтрофілів [2, 11-14].

Процес сенсibiliзації організму супроводжується нагромадженням ЦІК, і визначення їх рівня в сироватці крові розцінюється як маркер активності патологічного процесу (аутоімунних чи алергічних захворювань).

Відтворення феномену Артюса — місцевої гіперергічної алергічної реакції, яка займає проміжне положення поміж реакціями негайного та уповільненого типу — лежить в основі вивчення специфічної безпечності профілактичних препаратів. На початкових стадіях розвитку вона ближче до анафілактичних реакцій, подальший його розвиток зближує його з реакціями уповільненого типу [12].

Як свідчать дані літератури, постановка реакції імунолейкоцитолізу нейтрофілів при інкубації їх з досліджуваними антигенними препаратами — з визначенням показників пошкодження нейтрофілів (ППН) — вказує на ступінь сенсibiliзації організму і дозволяє прогнозувати вірогідні наслідки вакцинації [11, 13, 14].

Епідемічний підйом дифтерії в 90-ті роки минулого сторіччя продемонстрував, що поки існує циркуляція збудника серед населення завдяки бактеріоносійству інфекції, до тих пір існує загроза ускладнень епідемічної ситуації [8, 15, 17]. Сучасні протидифтерійні вакцини, спрямовані на створення антитоксичного гуморального імунітету, який перш за все захищає людину від фатального перебігу захво-

рювання, не перешкоджають існуванню мікробної популяції збудника дифтерії. До 66% від усіх післявакцинальних ускладнень (анафілактичний шок, алергічний дерматит, набряк Квінке, інші алергічні реакції, судоми), обумовлених профілактичними препаратами, спостерігаються при застосуванні АКДП вакцини — з частотою від 0,3 до 90 на 100 тис. вакцинованих [1, 3].

Отже, коли йдеться про розробку ад'ювантів стосовно дифтерійної вакцини, то з метою підвищення її ефективності було б слушним уведення до складу дифтерійного анатоксину специфічного бактеріального компоненту, котрий забезпечував би колонізаційну резистентність щеплених осіб завдяки включенню клітинно-опосередковані ланки імунної системи, був безпечним та, бажано, володів потенціуючою дією стосовно дифтерійного анатоксину і, можливо, десенсибілізуючими властивостями щодо сучасних протидифтерійних вакцин.

Такий підхід підкріплюється результатами досліджень колективу авторів з ФДУ «Московський науково-дослідний інститут епідеміології і мікробіології імені Г.Н.Габричевського Міністерства охорони здоров'я Російської Федерації» зі створення бактеріальної протидифтерійної вакцини. Дослідниками був запропонований препарат «Дифтерійна бактеріальна вакцина рідка», яка являє собою суспензію основного компонента клітинних стінок штаму коринебактерій дифтерії — речовини пептидоліпополісахаридної природи [7, 16].

Попередніми нашими дослідженнями було показано принципову можливість стимулювання гуморального імунітету проти дифтерії не лише при сумісному введенні дифтерійного анатоксину та ультразвукових дезінтегратів мікробних клітин *Corynebacterium diphtheriae*, але й при самостійному їх введенні, а також стимулювання фагоцитарної активності [5, 6]. Проте препарати на основі дезінтегрованих мікробних клітин виявилися реактогенними при випробуванні їх специфічної безпечності, що вимагало заходів щодо усунення їх реактогенності [4].

Метою дослідження було вивчення безпечності експериментальних зразків очищених антигенних фракцій збудника дифтерії, отриманих за допомогою ультразвукової дезінтеграції та препаративної гель-хроматографії, шляхом визначення показників пошкодження нейтрофілів, циркулюючих імунних комплексів та шкірної реакції на введення досліджуваних препаратів.

**МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ
ДОСЛІДЖЕННЯ**

Для отримання антигенних комплексів коринебактерій дифтерії був використаний виробничий штам *Corynebacterium diphtheriae* var. *gravis* токсигенний, massachusetts, наданий ПАТ «ФАРМСТАНДАРТ-БІОЛІК».

Мікробний дезінтеграт отримували за власною методикою [4]. Мікробну масу збудника дифтерії суспендували у фізіологічному розчині та інактивували в інактиваторі LW-1 при 56°C впродовж однієї години, потім тричі відмивали стерильним фізіологічним розчином (рН 7,2), мікробні клітини 12 год. витримували в 20% розчині NaCl, знову відмивали та ресуспендували для подальшої обробки ультразвуком.

Стандартизували мікробні суспензії за оптичною щільністю, яка визначалась на електронному приладі Densi-La-Meter (виробництво PLIVA-Lachema, Чехія).

Дезінтеграція мікробних клітин здійснювалась за допомогою обробки суспензії опроміненням ультразвукового генератора УСУ-0707(ТУ 3468-001-42369179-03) з частотою 130 кГц і потужністю 9 Вт.

Дезінтеграт центрифугували впродовж 30 хв. при 6000 об./хв. (2600 g) (центрифуга лабораторна ОПН-3) та відбирали супернатант.

Підвищення концентрації білка в супернатанті досягалося шляхом випарювання. Визначення концентрації білка здійснювалось на спектрофотометрі СФ-56 «Ломо-спектр».

Ультрацентрифугування супернатанта здійснювали на ультрацентрифузі MSE Super Speed 65 (виробництво Англії); вакуум-насос Arthur Pfeiffer Wetzlar № 71369.

Препаративна гель-хроматографія супернатанта ультразвукового дезінтеграта мікробної суспензії збудника дифтерії прово-

дилася на обладнанні фірми LKB (Швеція), наданому ДУ «Інститут кріобіології і кріомедицини АМН України». Очистку та фракціонування отриманих розчинних антигенних комплексів проводили на колонці, заповненій гелем TSK-GEL TOYOPEARL HW-60 Fine. В якості елюента використовували фосфатно-сольовий буфер (Na₂HPO₄ / NaH₂PO₄ – 30 ммоль/л, NaCl – 100 ммоль/л (рН 7,4)). Швидкість рухливої фази становила 1,7 мл/хв. Буфер до колонки подавався перистальтичним насосом (LKB-2132 Microperplex) через петельний інжектор зі змінними петлями. Реєстрацію оптичної щільності елюатів проводили за допомогою ультрафіолетового монітора при довжині хвилі 254 нм. Розділені антигени збирали за допомогою колектора фракцій. Для визначення молекулярних мас пептидних фракцій використовували колонку, попередньо калібровану стандартними речовинами.

Показники пошкодження нейтрофілів визначали з досліджуваними антигенними препаратами збудника дифтерії [14].

Визначення рівня ЦІК у сироватці крові піддослідних тварин до і після імунізації очищеними антигенними фракціями збудника дифтерії проводили шляхом селективної преципітації поліетиленгліколем (з використанням ПЕГ 6000) відповідно стандартній методиці [12].

Вивчення специфічної безпечності антигенних препаратів проводилося згідно з «Регламентом виробництва очищеного адсорбованого дифтерійного анатоксину» ПАТ «Біолек-Фармстандарт» на кролях вагою 2500-3000 г. За 24 год. до експерименту у тварин зістригали шерсть. Внутрішньошкірно вводили по 0,2 мл досліджуваних антигенних препаратів. За тваринами спостерігали впродовж 4 діб, реєструючи появу шкірних реакцій.

ТАБЛИЦЯ 1

Показники пошкодження нейтрофілів у крові піддослідних кролів під дією досліджуваних антигенних препаратів збудника дифтерії

№ тварин	Антигенна фракція збудника дифтерії (Мм, Да)	Контроль			Дослід		
		Всього нейтрофілів (абс.)	в тому числі (абс., М±m)		Всього нейтрофілів (абс.)	в тому числі (абс., М±m)	
			цілих	пошкоджених		цілих	пошкоджених
1-2	Від 6000	64	49 76,6±5,3	15 23,4±5,3	51	27 52,9±7,0	24 47,1±7,0
3	Від 5000	36	20 55,6±8,3	16 44,4±8,3	41	24 58,5±7,7	17 41,5±7,7
4-8	Від 1000 до 5000	43	34 79,1±6,2	9 20,9±6,2	72	46 63,9±5,7	26 36,1±5,7

ТАБЛИЦЯ 2

Рівень циркулюючих імунних комплексів у кролів в процесі імунізації досліджуваними антигенними препаратами

№ тварин	Антигенні препарати	Рівень ЦІК			
		перед імунізацією		через 2 тижні після імунізації	
		Середньомолекулярні ЦІК	Крупномолекулярні ЦІК	Середньомолекулярні ЦІК	Крупномолекулярні ЦІК
1	«+»	0,05	-	0,03	-
2	«+»	-	0,045	0,03	0,065
3	«++»	-	-	-	-
4	«++»	0,035	0,05	0,03	0,05
5	«+++»	0,045	0,045	0,03	-
7	«+++»	0,06	-	-	-
8	«++++»	-	-	-	-
9	«++++»	0,035	0,06	-	-
Середній рівень		0,045±0,007	0,05±0,004	0,03	0,0575

Примітки: характеристика антигенних фракцій, взятих для імунізації тварин, за їх молекулярною масою: «+» – понад 12 тис. дальтон, «++» – від 7 до 10 тис. дальтон, «+++» – від 6 тис. дальтон, «++++» – від 5 тис. дальтон; «-» – рівень ЦІК визначити не вдалося за недостатністю матеріалу для аналізу.

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Застосування авторського методу отримання очищених антигенних фракцій збудника дифтерії за допомогою середньочастотного ультразвука та препаративної гель-хроматографії дозволило отримати з промислового штаму *C.diphtheriae* var. *gravis* токсигенний, massachusetts 8 антигенних препаратів з наступними молекулярними масами: понад 12000, від 7000 до 10000, 6000-7000, 5000-6000, 4000-5000, 3000-4000, 2000-3000, 1000-2000 і до 1000 дальтон.

Усі вісім отриманих у результаті препаративної гель-хроматографії фракцій *C.diphtheriae* перевірили в тесті їх впливу на нейтрофіли *in vitro* (табл. 1).

Як видно з наведених даних, показник ППН в дослідних зразках з антигенами, молекулярна маса яких була від 6 тис. до 12 тис. дальтон, був

достовірно вищий (в 2 рази) контрольних показників ($t > 2$). Фракції з молекулярною масою від 1 тис. до 6 тис. дальтон не проявляли сенсibilізуючої дії на нейтрофіли (табл. 1).

Оцінку токсичності виділених фракцій проводили також за характером утворення ЦІК при введенні антигенів. З табл. 2 видно, що в процесі імунізації показники як середньомолекулярних, так і високомолекулярних імунних комплексів у тварин істотно не змінювались (табл. 2).

Отже, виділені фракції за вищенаведеними експериментальними даними, не володіють алергічними властивостями.

Вивчення сенсibilізуючої дії антигенних фракцій та можливості їх десенсibilізуючого впливу відносно до розвитку дермонекротичних реакцій проводили в два етапи. На першому етапі експерименту проводили алергометричне титрування антигенів (табл. 3).

ТАБЛИЦЯ 3

Результати алергометричного титрування досліджуваних антигенних препаратів у піддослідних кролів

№ тварин	Антигенні препарати з молекулярною масою	Розведення препаратів, діаметр гіперемії або інфільтрату, мм				
		цільний	1:10	1:100	1:1000	1:10000
1-2	понад 12 тис. Да	немає	немає	немає	немає	немає
3-4	від 7 до 10 тис. Да	немає	немає	немає	немає	немає
5-6	від 6 тис. Да	гіперемія 10-12 мм	гіперемія 10 мм	немає	немає	немає
7-8	від 5 тис. Да	немає	немає	немає	немає	немає
9-11	фізіологічний розчин (К) *	немає	немає	немає	немає	немає

Примітка: * (К) – контроль.

Перед введенням препаратів тваринам зістригали шерсть з боків. На наступний день на відстані 5 см вводили внутрішньошкірно одноразово по 0,01 мл антигенні препарати *S.diphtheriae*, котрі мали вихідну концентрацію білка від 17 до 34 мкг. Наявність шкірної реакції враховували через 24 год.

Наведені дані свідчать про те, що більшість препаратів виявилися неореактогенними. Шкірна реакція у вигляді гіперемії спостерігалась лише у випадку введення цільного антигену з молекулярною масою від 6 до 7 тис. дальтон та його розведення 1:10.

ВИСНОВКИ

Таким чином, досліджувані очищені антигенні препарати, отримані з виробничого штаму *Corynebacterium diphtheriae* var. *gravis* токсигенний, *massachusetts* за допомогою ультразвукової дезінтеграції з подальшим ультрацентрифугуванням та препаративною гель-хроматографією, виявилися переважно неореактогенними в експериментах *in vitro* (визначення показників пошкодження нейтрофілів) і на лабораторних тваринах (циркулюючі імунні комплекси, дермонекротичні реакції) за виключенням фракцій з молекулярною масою від 6000 до 7000 Да, які продемонстрували підвищений рівень показників пошкодження нейтрофілів у порівнянні з контролем ($t > 2$), а також обумовили розвиток запальних інфільтратів при підшкірному їх введенні підслідним тваринам.

ЛІТЕРАТУРА

- Алешина Р.М. Аллергические реакции как поствакцинальные осложнения [Текст] / Р.М.Алешина, Б.А.Ребров, В.В.Лейкина // Укр. журнал екстремальної медицини ім. Г.О.Можаєва. — 2010. — Т.11, №1. — С. 6-14.
- Бережная Н.М. Нейтрофилы и иммунологический гомеостаз [Текст] / Н.М.Бережная. — Киев: Наукова думка, 1988. — 192 с.
- Брагинская В.П. Активная иммунизация и профилактика поствакцинальных осложнений у детей [Текст] / В.П.Брагинская, А.Ф.Соколова. — М.: Медицина, 1990.
- Біологічна характеристика антигенів збудника дифтерії, виділених за допомогою фізико-хімічних методів [Електронний ресурс] / І.В.Єлисеєва, Є.М.Бабич, Л.А.Ждамарова [та ін.] // Аналі Мечніковського інституту. — 2008. — №3. — С. 25-31. — Режим доступу: <http://www.imiamn.org.ua/journal.htm>
- Антигенні та ад'ювантні властивості експериментальних зразків препаратів субклітинних комплексів збудника дифтерії при щепленні лабораторних тварин [Електронний ресурс] / І.В.Єлисеєва, Є.М.Бабич, Л.А.Ждамарова [та ін.] // Аналі Мечніковського інституту. — 2009. — №2. — С. 58-66. — Режим доступу: <http://www.imiamn.org.ua/journal.htm>
- Вивчення впливу експериментальних зразків препаратів субклітинних комплексів збудника дифтерії на активність фагоцитозу при щепленні лабораторних тварин [Електронний ресурс] / І.В.Єлисеєва, Є.М.Бабич, Л.А.Ждамарова та [ін.] // Аналі Мечніковського інституту. — 2009. — №4. — С. 19-23. — Режим доступу: <http://www.imiamn.org.ua/journal.htm>
- Кондрашина Н.Н. Выделение и иммунохимическая характеристика растворимых мембранных белков клеточных стенок коринебактерий дифтерии [Текст] / Н.Н.Кондрашина, Е.А.Шмелева, С.Ф.Берестень // Биохимия. — 1987. — Вып.6, Т.52. — С. 978-983.
- Костюкова Н.Н. Уроки дифтерии [Текст] / Н.Н.Костюкова // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. — М.: С-Инфо, 1999. — №2. — С. 92-96.
- Манько В.М. Иммуномодуляция: история, тенденции развития, современное состояние и перспективы [Текст] / В.М.Манько, Р.М.Петров., Р.М.Хайтов // Иммунология. — 2002. — №3. — С. 132-138.
- Медуницин Н.В. Вакцинология. [Текст] / Н.В.Медуницин. — М: Триада-Х, 1999. — 272 с.
- Мельник В.А. Некоторые закономерности развития иммунопатологических реакций на антигены коревой, паротитной и АКДС вакцин у здоровых детей раннего возраста и у больных с проявлениями аллергии [Текст] / В.А.Мельник // Актуальные вопросы амбулаторно-поликлинической и стационарной помощи детям. — Харьков, 1989. — С. 30-33.
- Новиков Д.К. Оценка иммунного статуса [Текст] / Д.К.Новиков, В.И.Новикова. — Москва-Витебск, 1996. — 281 с.
- Пыцкий В.И. Взаимодействие аллергии и иммунитета [Текст] / В.И.Пыцкий // Иммунология. — 1980. — №3. — С. 82-86.
- Фрадкин В.А. Диагностика аллергии реакциями нейтрофилов крови [Текст] / В.А.Фрадкин. — М.: Медицина, 1985. — 176 с.
- Чудная Л.М. Эпидемиологическая ситуация по дифтерии на Украине [Текст] / Л.М.Чудная, В.Г.Оксинок, Л.С.Красюк, Л.В.Мороз, С.И.Брыжата, И.М.Скуратовская, Е.В.Демиховская // Эпидемиология и инфекционные болезни. — 1999. — №1. — С. 10-12. — Библ. с. 12 (1 назв.). — ISSN 1560-9529. Держатели документа: ОмГМА.
- Характеристика дифтерийной бактериальной вакцины и результаты ее исследования в эксперименте и на людях / Е.А.Шмелева, Д.П.Никитин, А.Н.Кузиков [та ін.] [Текст] / Тез. докл. V Всерос. съезда микробиол. и эпидемиол. — М., 1985. — С. 69-71.
- Diphtheria remains a threat to health in the developing world — an overview [Текст] / A.L.Mattos-Guaraldi, L.O.Moreira, P.V.Damasco, R.Hirata Júnior // Mem. Inst. Oswaldo Cruz. — 2003. — Vol. 98. — P. 987-989.

18. Safety of adjuvants. Extract from report of Global Advisory Committee on Vaccine Safety meeting of 10-11 June 2004, published in the WHO Weekly Epidemiological Record on 16 July 2004. — Режим доступу: http://www.who.int/vaccine_safety/topics/adjuvants/June_2004/en/index.html
19. Effects of a diphtheria-tetanus-acellular pertussis vaccine on immune responses in murine local lymph node and lung allergy models [Text] / R.J.Vandebriel, E.R.Gremmer, van Hartkamp M. [et al.] // Clin. Vaccine Immunol. — 2007. — Vol. 14 (3). — P. 211-219. — Режим доступу: www.rivm.nl/bibliotheek/artikelen/artikelen2007.html
20. An algorithm for treatment of patients with hypersensitivity reactions after vaccines [Text] / R.A.Wood, M.Berger, S.C.Dreskin [et al.] // Pediatrics. — 2008. — Vol. 122 (3). — P. 771-777. — Режим доступу: <http://pediatrics.aappublications.org/cgi/content/abstract/122/3/e771>

Е.М.Бабич, И.В.Елисеєва, Л.А.Ждамарова, В.И.Белозерский, И.В.Бобырева. Изучение безопасности очищенных антигенных фракций возбудителя дифтерии, полученных при помощи физических факторов. Харьков, Украина.

Ключевые слова: возбудитель дифтерии, антигенные фракции, ультразвуковая дезинтеграция, препаративная гель-хроматография, безопасность, показатели повреждения нейтрофилов, циркулирующие иммунные комплексы, дермонекротическое действие.

Исследована безопасность очищенных антигенных препаратов, полученных из производственного штамма *Corynebacterium diphtheriae var. gravis* токсигенный, massachusetts при помощи ультразвуковой дезинтеграции с последующим ультрацентрифугированием и препаративной гель-хроматографией, в экспериментах *in vitro* (определение

показателей повреждения нейтрофилов) и на лабораторных животных (определение циркулирующих иммунных комплексов, дермонекротическое действие). Все антигенные фракции, за исключением фракций с молекулярной массой 6000-7000 дальтон, которые продемонстрировали повышенный уровень показателей повреждения нейтрофилов в сравнении с контролем ($t > 2$), а также обусловили развитие воспалительных инфильтратов при подкожном их введении подопытным животным, оказались нереактогенными.

Ye.M.Babych, I.V.Yelyseyeva, L.A.Zhdamarova, V.I.Belozersky, I.V.Bobireva. Immunological activity of diphtheriae pathogen antigens fractions obtained by the use of physical agents. Kharkiv, Ukraine.

Key words: diphtheria pathogen, antigenic fractions, ultrasound disintegration, gel chromatography, safety, neutrophil damage index, circulating immune complexes, dermonecrotic effect.

The study is devoted to research of safety *in vitro* (neutrophil damage index) and in laboratory animal experiments (circulating immune complexes, dermonecrotic effect) of refined diphtheria pathogen antigens obtained from the productive strain *Corynebacterium diphtheriae var. gravis* toxigenic, massachusetts by the use of ultrasound disintegration of microbe cells with followed ultracentrifugation and preparative gel chromatography. It's shown that all obtained fractions were safety with the exception of fraction with molecular weight 6000-7000 daltons, which have demonstrated increased neutrophil damage index level in comparison with control ($t > 2$), and caused inflammatory infiltration development when injecting to experimental animals.

Надійшла до редакції 10.11.2011 р.