

# МІКРОБІОЛОГІЯ

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

УДК 615.371:579.871.1:616-097

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

## ІМУНОЛОГІЧНА АКТИВНІСТЬ АНТИГЕННИХ ФРАКЦІЙ ЗБУДНИКА ДИФТЕРІЇ, ОДЕРЖАНИХ ЗА ДОПОМОГОЮ ФІЗИЧНИХ ЧИННИКІВ

**ДУ «ІМІ мікробіології та імунології ім. І. І. Мечникова АМН України» (м. Харків)**

Дана робота є фрагментом НДР, № держ.реєстрації 0111U004734.

**Вступ.** Висновки, зроблені з останнього епідемічного підйому дифтерії у 90-ті роки минулого сторіччя, примушують вчених продовжувати пошуки шляхів підвищення ефективності її вакцинопрофілактики [5-7, 11, 13, 15].

Існуючі вакцинні препарати проти дифтерії представлені дифтерійним анатоксином у складі різних багатокомпонентних вакцин і спрямовані на стимулювання специфічного антитоксичного імунітету [10].

Зазвичай вони лише попереджають розвиток гострого інфекційного процесу або полегшують його перебіг, тоді як персистуванню збудника вони перешкодити не здатні, а тому не спроможні запобігти його поширенню серед населення [7, 12, 13].

Тому було б доцільним при здійсненні імунопрофілактики в населення впливати не лише на формування гуморального антитоксичного імунітету, а й стимулювати антибактеріальний імунітет проти дифтерії. Це завдання розв'язується при розробці комбінованої вакцини проти дифтерії, яка містила б дифтерійний анатоксин і безпечний, нетоксичний ад'ювант мікробного походження, здатний стимулювати клітинно-опосередковані ланки імунної системи, Т-лімфоцити, забезпечити повний контакт збудника інфекції з різними елементами імунної системи макроорганізму. Бактеріальні субклітинні антигенні комплекси збудника дифтерії могли б стати саме таким специфічним ад'ювантом. В Росії, наприклад, на основі ультразвукової дезінтеграції клітинних стінок збудника дифтерії, розроблено бактеріальну вакцину, призначену для боротьби з носійством коринебактерій дифтерії, яке визначає збереження резервуару інфекції в людській популяції [5, 12].

Можливою альтернативою хімічним технологіям одержання антигенів патогенних бактерій є фізичні методи [1, 2, 9]. Вони відкривають перспективу налагодження випуску нативних хімічно не змінених, а значить більш специфічних, вакцинних препаратів. Фізичні методи легко реалізуються в стандартних умовах, відпадає необхідність в технологічних операціях по очищенню виділених антигенних структур від хімічних речовин.

Попередніми нашими дослідженнями (№ держреєстрації 0108U001295), присвяченими розробці підходів до удосконалення вакцинних препаратів проти дифтерії шляхом одержання антигенних мікробних фракцій збудника, які б

підвищували протибактеріальний імунітет як фактор локалізації дифтерійної інфекції в організмі та стимулювали б розвиток антитоксичного імунітету, показано, що всі досліджувані препарати субклітинних комплексів дифтерії, які відрізнялись один від одного ступенем дезінтеграції мікробних клітин – цільноклітинна формалінізована дифтерійна вакцина, ультразвуковий дезінтеграт мікробних клітин та супернатант дезінтеграту – здатні стимулювати гуморальний антитоксичний імунітет при їх введенні з очищеним концентрованим (несорбованим на гідроксиді алюмінію) дифтерійним анатоксином, а деякі з них і самостійно (дезінтеграт, вбита формаліном цільноклітинна вакцина) під час використання різних схем щеплення (парентеральних, пероральних, комбінованих) і різних доз дифтерійного анатоксину (1-2 Lf або 20 Lf п/ш, 600 і 1200 Lf per os) [1, 2].

Проте результати вивчення специфічної безпечності досліджуваних антигенних препаратів субклітинних комплексів збудника дифтерії свідчили про їх реактогенність, яка корелювала як зі ступенем дезінтеграції мікробних клітин, так і з концентрацією білку в препараті: відповідно,  $\rho_1=0,9$ ,  $\rho_2=0,6$  (неопубл. дані).

Поява і розвиток шкірних реакцій на введені препарати у віддалені строки (на 8-15-у добу після ін'єкції) потребувала удосконалення технології їх виготовлення, поглибленого вивчення їх нешкідливості та встановлення і збалансування параметрів ефективності й безпечності.

**Метою дослідження** було виділення очищених мікробних антигенів *Corynebacterium diphtheriae* та вивчення їх імунологічної активності.

**Об'єкт і методи дослідження.** Для одержання антигенних комплексів коринебактерій дифтерії об'єктом дослідження був виробничий штам *Corynebacterium diphtheriae* var. *gravis* токсигенний, massachusetts, наданий ПАТ «ФАРМСТАНДАРТ-БІО-ЛІК», та одержані з нього білкові антигенні фракції.

Одержання антигенних препаратів з мікробної маси *C. diphtheriae* відбувалося за принциповою схемою, яка складалася з наступних етапів: (1) мікробну масу *C. diphtheriae* суспендували у фізіологічному розчині; (2) суспензію інактивували та перевіряли на відсутність росту мікроорганізмів; (3) тричі відмивали мікробні клітини фізіологічним розчином; (4) ресуспендували 20 %-им сольовим розчином; (5) відмивали фізіологічним розчином; (6) мікробну завесь піддавали обробці ультразвуком;

(7) розділяли супернатант і осад шляхом центрифугування; (8) супернатант додатково звільняли від уламків мікробних клітин шляхом ультрацентрифугування; (9) концентрували антигенні препарати (мікробні дезінтеграти та супернатанти) випарюванням; (10) одержані препарати піддавали препаративній гель-хроматографії; (11) очищені антигенні фракції характеризували за молекулярною масою та концентрацією білку.

Вивчення імунологічної активності досліджуваних антигенних препаратів здійснювалось на лабораторних тваринах у трьох напрямках: дослідження прямого впливу на формування антитоксичного протидифтерійного імунітету, визначення ад'ювантної активності щодо гуморального імунітету та визначення протективних властивостей.

Протидифтерійний антитоксичний імунітет вивчали в реакції пасивної гемаглютинації (РПГА) за стандартною методикою, викладеною в інструкції, що додається до діагностичного дифтерійного антигенного рідкого еритроцитарного (серія 109, титр 1:3200, придатний до 03.11, виробництва ОАО „Біомед” ім. І. І. Мечникова, Росія).

Перед кожною серією досліджень перевірялася активність діагностичного зі стандартними сироватками. Всього з дифтерійним діагностичним досліджено сто тридцять зразків крові піддослідних кролів. Кров відбиралась за допомогою шприцу із застосуванням правил асептики з вушної вени через тиждень упродовж місяця після імунізації, а надалі – через тиждень або через місяць в залежності від результатів РПГА.

Імуногенні та ад'ювантні властивості досліджували при підшкірній імунізації кролів середньою вагою близько 3 кг. Вивчення протективної дії експериментальних дифтерійних вакцин здійснювалось на 6 мурчаках вагою ~ 300 г.

Усі тварини в ході експерименту отримували стандартний раціон віварію, мали відповідні умови утримання відповідно до рекомендованих [3, 4, 8].

Експерименти на лабораторних тваринах проводились відповідно до вимог і загальних принципів експериментів на тваринах, схвалених І Національним конгресом біоетики (20. 09. 01 р., м. Київ, Україна) та норм біомедичної етики відповідних закону "Про захист тварин від жорстокого поводження" (28. 12. 06 р., м. Київ, Україна) і погоджених з положеннями "Європейської конвенції з захисту хребетних тварин, що використовуються в експериментальних та інших дослідних цілях (Страсбург, Франція, 1986).

**Результати досліджень та їх обговорення.** Застосування методу одержання антигенних фракцій за допомогою середньочастотного ультразвуку та препаративної гель-хроматографії з промислового штаму *C.diphtheriae* var. *gravis* токсигенний, massachusetts дозволило одержати 8 антигенних препаратів з молекулярними масами понад 12000, від 7000 до 10000, 6000-7000, 5000-6000, 4000-5000, 3000-4000, 2000-3000, 1000-2000 і до 1000 дальтон. В експерименті на лабораторних тваринах використовувалися фракції з молекулярною масою понад 5000 Да (**табл.**).

З **таблиці** видно, що підшкірна імунізація тварин одержаними антигенними фракціями (концентрація білку в них – 17-34 мкг/ мл) не привела до формування антитоксичного імунітету – №№ 6-9 (**табл.**).

В той же час антигени підсилювали гуморальний імунітет при сумісному їх введенні з дифтерійним анатоксином, тобто виявляли ад'ювантну дію: в контролі – швидкий, вже з першого тижня, інтенсивний підйом рівня антитоксичних антитіл до 32 МО і таке ж швидке, з другого тижня, зниження титрів антитіл до 0,25 МО. У піддослідних тварин значний рівень гуморального імунітету проти дифтерії стабільно спостерігався впродовж місяця (**табл.**).

Вивчення протективної активності проводилося для тих антигенних фракцій *C. diphtheriae*, котрі показали значну ад'ювантну дію у попередніх дослідках, а саме: з молекулярною масою понад 12 000 Да та від 6000 до 7000 Да.

Таблиця

**Результати вивчення антигенної та ад'ювантної дії досліджуваних антигенних фракцій *C. diphtheriae***

№№ пп	Склад введеного препарату	Відбір зразків крові для РПГА			
		1-й тиждень	2-й тиждень	3-й тиждень	4-й тиждень
1	0,4 мл (20 Lf) АД +1,0 мл фіз. розчину	1:10240 / 32 МО	1:80 / 0,25 МО	1:80 / 0,25 МО	1: 80 / 0,25 МО
2	0,4 мл (20 Lf) АД +1,0 мл препарату «+»	1:10240 / 32 МО	1:10240 / 32 МО	1:10240 / 32 МО	1:10240 / 32 МО
4	0,4 мл (20 Lf) АД +1,0 мл препарату «+++»	1:10240 / 32 МО	1:10240 / 32 МО	1:640 / 2 МО	1:1280 / 4 МО
5	0,4 мл (20 Lf) АД +1,0 мл препарату «++++»	1:80 / 0,25 МО	1:10240 / 32 МО	1:320 / 1 МО	1:640 / 2 МО
6-9	1,0 мл препарату + 0,4 мл фіз. розчину	0	0	0	0

**Примітка:** Молекулярна маса антигенних фракцій, відповідно, «+» – понад 12 тис. дальтон, «+++» – від 6 тис. дальтон, «++++» – від 5 тис. дальтон.

Трьом групам морських свинок по 2 тварини в кожній було введено, відповідно, по 1,0 мл підшкірно препарати «+», «+++» і фізіологічний розчин в якості контролю. Концентрація білку в препаратах складала від 17 до 34 мкг/мл.

Враховуючи низький вміст білку у препаратах, через тиждень потому тварини вводили й мінімальну кількість дифтерійного тест-токсину: 5 або 1 DIm (мінімальна летальна доза) в кожній групі.

Тварини, які одержали 5 DIm, пали на 4-й день. Тварини, які одержали 1 DIm, вижили. В контрольній групі 1 тварина пала на 4-й день, одна – вижила.

**Висновки.** Отже хоча одержані очищені антигенні фракції, при низьких концентраціях білку, самостійно і не стимулювали формування протидифтерійного

антитоксичного імунітету, але виявили ад'ювантну дію щодо дифтерійного анатоксину.

Протективна дія обраних для досліджуваного антигенних препаратів потребує подальшого вивчення при підвищенні концентрації діючої речовини при введенні їх тваринам.

**Перспективи подальших досліджень.** Подальші дослідження планується проводити у напрямку вивчення безпечності одержаних антигенних фракцій, їх можливої десенсибілізуючої дії у відповідних схемах імунізації, визначення ефективності перорального застосування протективних антигенів збудників дифтерії для проведення десенсибілізації і попередження розвитку алергічних реакцій при посиленні імунотенної дії парентеральних вакцин.

### Список літератури

1. Єлисеєва І. В. 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: [www.imiamn.hutl.ru/journ](http://www.imiamn.hutl.ru/journ).
2. Єлисеєва І. В. 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: [www.imiamn.hutl.ru/journ](http://www.imiamn.hutl.ru/journ).
3. Карпенко В. В. Обезболивание животных в эксперименте [Текст] / В.В. Карпенко, В.И. Сачков // Методические рекомендации. - М., 1985. - 53 [1] с. - Тираж 1000
4. Кожем'якін Ю.М. Науково-практичні рекомендації утримання лабораторних тварин та роботи з ними [Текст] / Ю.М. Кожем'якін, О.С. Хромов М.А. Філоненко, Г.А. Сайфетдінова // Міністерство охорони здоров'я України, державний фармакологічний центр. - К., 2002. - 155 с.
5. 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. - Т. 52, Вып. 6. - С. 978-983.
6. Костюкова Н.Н. Уроки дифтерии [Текст] / Н.Н. Костюкова // Журн. микробиол. - 1999. - № 2. - С. 92-96.
7. Маркина С.С. Заболеваемость дифтерией в России в настоящее время [Текст] / С.С. Маркина, Н.М. Максимова, Г.Ф. Лазикова. // Журн. микробиол., 2005. - № 1. - С.31-37.
8. Наказ МОЗ СРСР № 1179 от 10.10.1983 «Об утверждении нормативов затрат кормов для лабораторных животных в учреждениях здравоохранения».
9. Сова В.В. Выделение и очистка белков. Методическое пособие по курсу "Химия и биохимия белков и ферментов" [Текст] / В.В. Сова, М.И. Кусайкин // Владивосток : изд-во Дальневост. Ун-та, 2006. - 42 с.
10. Учайкин В. Ф. Вакцинопрофилактика. Настоящее и будущее. [Текст] / В.Ф. Учайкин, О.В. Шамшева // М. : Гэотар-мед, 2001. - 400 с.
11. Чудная Л.М. Эпидемиологическая ситуация по дифтерии на Украине [Текст] / Л.М. Чудная, В.Г. Оксик, Л.С. Красюк [и др.] // Журн. эпидемиол. - 1999. - № 1. - С. 10-12.
12. Шмелева Е.А. Характеристика дифтерийной бактериальной вакцины и результаты ее исследования в эксперименте и на людях / Е.А. Шмелева, Д.П. Никитин, А.Н. Кузиков [и др.] [Текст] // Тез. докл. V Всерос. съезда микробиол. и эпидемиол. - М., 1985. - С. 69-71.
13. Шмелева Е.А. Специфические антитела и их роль в формировании противодифтерийного иммунитета [Текст] / Е.А. Шмелева, С.И. Макарова, И.Г. Батурина [и др.] // Журн. микробиол., 2005. - № 1. - С.38-43.
14. Kolodkina V. Molecular epidemiology of C. diphtheriae strains during different phases of the diphtheria epidemic in Belarus [Text] / Valentina Kolodkina, Leonid Titov [et al.] // BMC Infect Dis. - 2006. - V. 6. - P. 129-137.
15. Mattos-Guaraldi A.L. Diphtheria remains a threat to health in the developing world – an overview [Text] / A.L. Mattos-Guaraldi, L.O. Moreira, P.V. Damasco, Jъnior R. Hirata // Mem Inst Oswaldo Cruz. - 2003. - V. 98. - P. 987-989.

УДК 615.371:579.871.1:616-097

### ІМУНОЛОГІЧНА АКТИВНІСТЬ АНТИГЕННИХ ФРАКЦІЙ ЗБУДНИКА ДИФТЕРІЇ, ОДЕРЖАНИХ ЗА ДОПОМОГОЮ ФІЗИЧНИХ ЧИННИКІВ

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

**Резюме.** Дослідження присвячене одержанню очищених антигенів збудника дифтерії методом ультразвукової дезінтеграції мікробних клітин з наступною препаративною гель-хроматографією та вивченням їх антигенної, ад'ювантної та протективної дії в експерименті на лабораторних тваринах. Показано, що одержані фракції виявили істотну ад'ювантну дію при імунізації тварин в поєднанні з дифтерійним анатоксином навіть при мінімальних концентраціях білку. Протективна дія досліджуваних препаратів потребує подальшого вивчення при імунізації тварин підвищеними концентраціями діючої речовини.

**Ключові слова:** збудник дифтерії, антигенні фракції, ультразвукова дезінтеграція, гель-хроматографія, гуморальний імунітет, ад'ювантна дія.

УДК 615.371:579.871.1:616-097

### **ИММУНОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ АНТИГЕННЫХ ФРАКЦИЙ ВОЗБУДИТЕЛЯ ДИФТЕРИИ, ПОЛУЧЕННЫХ ПРИ ПОМОЩИ ФИЗИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ**

**Елисеева И. В., Бабич Е. М., Ждамарова Л. А., Белозерский В. И., Бобырева И. В.**

**Резюме.** Исследование посвящено получению очищенных антигенов возбудителя дифтерии методом ультразвуковой дезинтеграции микробных клеток с последующей препаративной гель-хроматографией и изучению их антигенного, адьювантного и протективного действия в эксперименте на лабораторных животных. Показано, что полученные фракции выявили существенное адьювантное действие при иммунизации животных в сочетании с дифтерийным анатоксином даже при минимальных концентрациях белка. Протективное действие исследуемых препаратов требует дальнейшего изучения при иммунизации животных повышенными концентрациями действующего вещества.

**Ключевые слова:** возбудитель дифтерии, антигенные фракции, ультразвуковая дезинтеграция, гель-хроматография, гуморальный иммунитет, адьювантное действие.

UDC 615.371:579.871.1:616-097

### **Immunological Activity Of Diphtheriae Pathogen Antigens Fractions Obtained By Physical Agents**

**Yelyseyeva I. V., Babych Ye. M., Zhdamarova L. A., Belozersky V. I. , Bobireva I. V.**

**Summary.** The study is devoted to obtaining of refined diphtheria pathogen antigens by the use of ultrasound disintegration of microbe cells with followed preparative gel chromatography and research of their antigenic, adjuvant and protective effects in laboratory animal experiments. It's shown that obtained fractions have demonstrated significant adjuvant effect when animal immunizing even with low protein concentrations. Protective effect of preparation under study need subsequent examination when animal immunizing with reactant increased concentration.

**Key words:** diphtheriae pathogen, antigenic fractions, utrasound disintegration, gel chromatography, humoral immunity, adjuvant effect.

Стаття надійшла 27.02.2012 р.