

**ВИВЧЕННЯ ДЕСЕНСИБІЛІЗУЮЧОЇ ДІЇ ОЧИЩЕНИХ АНТИГЕННИХ ФРАКЦІЙ
ЗБУДНИКА ДИФТЕРІЇ, ОДЕРЖАНИХ ЗА ДОПОМОГОЮ
ФІЗИЧНИХ ЧИННИКІВ****ДУ «Інститут мікробіології та імунології ім. І. І. Мечникова АМН України» (м. Харків)**

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

Вступ. На сьогоднішній день в багатьох країнах інтенсивно проводяться дослідження в напрямку боротьби з алергічними захворюваннями у дітей та дорослих, що має велике значення для зниження кількості побічних реакцій при вакцинації таких контингентів [1, 9, 11, 12, 15, 17-19].

В світі накопичений багаторічний досвід боротьби з алергічною патологією шляхом імунотерапії алергенами, біля джерел якої стоїть відкритий російським вченим А. М. Безредка, учнем І. І. Мечникова, метод десенсибілізації. Специфічна імунотерапія алергенами (СІТ) вважається єдиним методом лікування, здатним давати тривалий ефект ремісії після завершення лікування [13, 14, 19]. Зниження чутливості сенсibilізованого організму до специфічного алергену при повторних ін'єкціях його невеликих доз – специфічна гіпосенсибілізація – з успіхом використовується у клініці для лікування ІgЕ опосередкованих алергічних захворювань – (полінозів, алергічних ринітів, кон'юнктивітів, атопічної бронхіальної астми) та вакцинотерапії бактеріальними алергенами при інфекційно-алергічній бронхіальній астмі.

На тлі введення в поступово зростаючих дозах сенсibilізуючого антигену пригнічується клітинна картина алергічного запалення – знижується число базофілів, еозинофілів, тучних клітин, зменшується ІgЕ-опосередковане звільнення гістаміну із базофілів [10, 11]. Гальмується як рання, так і пізня фази алергічної реакції негайного типу, неспецифічна та специфічна гіперреактивність бронхів при бронхіальній астмі, продукуються «блокуючі» антитіла.

В практичній алергології імунотерапія алергенами була вперше використана ще у 1911 році Нуном і Фріменом при пилковій алергії, в 1921 році Кауфілдом при астмі. В Росії розвиток методів гіпосенсибілізації пов'язаний з ім'ям академіка А. Д. Адо і його школи [2]. Проте складність оптимального дозування алергенів та введення їх парентерально приводила часто до важких ускладнень (маніфестації клініки хвороби, яка перебігає безсимптомно, декомпенсації хронічних процесів та ін.) [15-17].

Набагато більш безпечною виявилась пероральна, сублінгвальна вакцинація, яка при високій ефективності рідко дає побічні реакції [18]. Вважається, що мукозальні вакцини індукують активну продукцію антитіл особливо класу Іg А, тому можуть бути використані для лікування алергічних захворювань [9-12].

Досягнення алерген-специфічної імунотерапії у лікуванні алергічних захворювань стали теоретичним підґрунтям для наших досліджень у напрямку підвищення ефективності та безпечності імунопрофілактики дифтерії. Відомо, що АКДП вакцина займає одне з провідних місць з числа післявакцинальних ускладнень, серед яких такі важкі алергічні прояви як анафілактичний шок, набряк Квінке, алергічний дерматит та ін. [1, 3, 5-7].

Попередніми нашими дослідженнями вивчались ультразвукові дезінтеграції мікробних клітин дифтерії, одержані за авторською методикою, які виявили імуногенні та ад'ювантні властивості щодо формування післявакцинального дифтерійного гуморального імунітету в піддослідних кролів, а також стимулювали фагоцитарну активність нейтрофілів [4-7].

Однак одержані препарати виявилися реактогенними при вивченні їх специфічної безпечності при підшкірному введенні. Саме тому в подальших експериментах ультразвукові мікробні дезінтеграції піддавали послідовному очищенню з виділенням антигенних фракцій за допомогою препаративної гель-хроматографії [4]. Очищені антигенні фракції характеризувались ад'ювантною активністю, стимулювали гуморальний протидифтерійний імунітет при введенні з очищеним дифтерійним анатоксином.

Мета дослідження - вивчення можливостей попередження розвитку післявакцинальних алергічних реакцій на протидифтерійні вакцини шляхом попереднього підшкірного введення очищених антигенних препаратів, одержаних за допомогою фізичних чинників з мікробних клітин виробничого штаму *Corynebacterium diphtheriae* var. *gravis* токсигенний, massachusetts.

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

Мікробний дезінтеграції та очищені антигенні фракції одержували за власною методикою [4-6].

Визначення десенсибілізуючої дії одержаних антигенних фракцій *C. diphtheriae* щодо феномену Артюса проводилося на 14 кролях масою близько 3 кг [2].

Кролів розподілили на чотири групи: одну дослідну і три контрольних. Кролям з першої групи попередньо підшкірно вводили досліджувані антигенні препарати за десенсибілізуючою схемою (через 1-2 дні в зростаючій дозі з кроком 0,2 мл, починаючи з

Динаміка формування дермонекротичної реакції в піддослідних тварин при введенні їм вакцини АД-м після попереднього підшкірного введення досліджуваних антигенних препаратів

№ № пп	Антигенний препарат (Мм, Да)	Вакцина	Дні вакцинації та діаметр інфільтратів після ін'єкції, мм					
			5-й	10-й	15-й	20-й	25-й	35-й
1.1	≥ 12 тис.	АД-м	6	8	немає	немає	немає	немає
1.2	≥ 12 тис.	АД-м	немає	немає	немає	немає	3	3
1.3	7 - 10 тис.	АД-м	немає	немає	немає	немає	3	3
1.4	7 - 10 тис.	АД-м	немає	3	немає	немає	немає	2
1.5	6 - 6,9 тис.	АД-м	немає	немає	немає	немає	3	2
1.6	5 - 5,9 тис.	АД-м	немає	немає	немає	немає	2	немає
2.7	-	АД-м (К)*	немає	немає	немає	3	3	2
2.8	-	АД-м (К)	немає	немає	3	3; 4	3; 4	немає
2.9	-	АД-м (К)	немає	немає	немає	3; 10	2; 6	2
3.10	-	АДП (К)	немає	3	3; 4	3; 3; 3	3; 3; 3	2; 3; 4
3.11	-	АДП (К)	8	10	14	14; 10	8; 8	8; 8
4.12	-	АКДП (К)	немає	6; 6	8; 9	6; 8	4; 6	2; 4
4.13	-	АКДП (К)	немає	6	6	12; 4	14 (некроз); 10	14 (некроз); 10
4.14	-	АКДП (К)	6; 3	10; 8; 8	6; 4; 3	6; 4; 3	6; 4	4

Примітка: (К)* - контроль.

0,1 мл до 1,1 мл). Надалі тваринам вводили АД-м вакцину по 0,5 мл підшкірно 5 разів через 5 днів і одну розріджуючу дозу через 10 днів.

Другий, третій і четвертій групі тварин (контрольні групи) вводили, від початку введення АД-м вакцини дослідній групі тварин, лише дифтерійні вакцини АД-м, АДП і АКДП, відповідно, по 0,5 мл підшкірно 5 разів через 5 днів і одну розріджуючу дозу через 10 днів. Характер шкірних реакцій (діаметр інфільтратів та зони некрозу) реєструвався через добу після кожної ін'єкції.

Утримання тварин та експерименти проводилися відповідно до положень «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментів та інших наукових цілей» (Страсбург, 1985), «Загальних етичних принципів експериментів на тваринах», ухвалених Першим національним конгресом з біоетики (Київ, 2001).

Результати досліджень та їх обговорення. Шкірних реакцій на жодну з ін'єкцій досліджуваних антигенних препаратів при їх введенні у поступово зростаючих дозах в піддослідних тварин зареєстровано не було.

В таблиці 1 представлені дані спостереження за динамікою формування дермонекротичних реакцій у тварин при багаторазовому введенні їм офіційних противодифтерійних вакцин в різних групах тварин (табл. 1).

Як видно з таблиці 1, розвиток запальної відповіді (гіперемія та інфільтрат) в дослідній групі в ранні строки (5-й і 10-й день) обумовлювали досліджувані

антигени з молекулярною масою 12 тис. і 7-10 тис. дальтон. Інші фракції дали шкірні прояви лише на 25-й і 35-й день імунізації. Найменш виражену запальну реакцію відмічено при сенсibiliзації тварин антигеном з молекулярною масою 5 тис. Да.

Кролі дослідної групи мали прояви шкірних реакцій у (30,6 ± 7,6) % спостережень. У тварин з контрольних груп реакції на введення АД-м вакцини та багатокомпонентних офіційних препаратів АДП і АКДП зареєстровані у (50 ± 12,1) %, (91,7 ± 8,3) % та (88,9 ± 7,6) % спостережень, відповідно. В 3-й і 4-й групах названі показники були істотно вищими, ніж у 1-ї та 2-ї групах тварин (t>2).

Отже, можна припустити, що йдеться про десенсибілізуючу дію антигенних препаратів щодо введення АД-м вакцини, при введенні їх за відповідною схемою.

Слід зауважити, що шкірні реакції за важкістю перебігу (запальні інфільтрати) в дослідній групі істотно не відрізнялися від гіперергічної відповіді у контрольних тварин, котрим попередньо не вводилися антигенні препарати, окрім вакцини АКДП, котра призвела до розвитку дермонекротичної реакції в одній з тварин відповідної контрольної групи (табл. 1). Проте середній діаметр інфільтратів в дослідній групі був мінімальним – 3 мм, в першій контрольній групі, імунізованій виключно АД-м препаратом, – 3,7 мм, в другій контрольній (реакція на АДП-вакцину) – 6 мм, в третій (реакція на АКДП-вакцину) – 6,6 мм (табл. 2).

Розміри та кількість шкірних реакцій відносно кількості ін'єкцій препаратів

Препарати імунізації	Дні подальшого введення антигенних препаратів та загальна кількість шкірних реакцій в кролів						Усього реакцій (n)	Усього ін'єкцій (k)	Коефіцієнт співвідношення (n/k)	Середній діаметр шкірних реакцій (M±m), мм
	5	10	15	20	25	35				
Антиген + АД-м	1	2	0	0	4	4	11	36	0,3	3,0 ± 0,6
АД-м	0	0	1	5	5	2	13	18	0,7	3,7 ± 0,6
АДП	1	2	3	5	5	5	21	12	1,75	6,0 ± 0,8
АКДП	2	6	6	7	6	5	32	18	1,78	6,6 ± 0,7

Якщо підсумовувати загальну кількість шкірних інфільтратів, то привертає увагу той факт, що взагалі у контрольних тварин, яким досліджували антигенні препарати попередньо не вводилися, коефіцієнт співвідношення кількості шкірних реакцій до числа ін'єкцій у 2,3 рази перевищує аналогічний показник дослідної групи (для вакцини АД-м). А для вакцин АДП і АКДП він виявився ще вищим: відповідно, у 5,8 – 5,9 разів (табл. 2).

Взагалі це ще раз ілюструє підвищену реактогенність саме комбінованих вакцин цієї групи профілактичних протидифтерійних препаратів і необхідність розробки заходів щодо специфічної десенсибілізації у практичній імунопрофілактиці.

Висновки. Попереднє парентеральне щеплення кролів поступово зростаючими дозами досліджуваних антигенних фракцій *Corynebacterium diphtheriae* var. *gravis* токсигенний, massachusetts, призвело до зменшення частоти та вираженості розвитку шкірних запальних інфільтратів на введення офіційної АД-м вакцини.

Перспективи подальших досліджень. Перспективними дослідженнями стане вивчення десенсибілізуючої дії антигенних препаратів збудника дифтерії у природних та відносно безпечних пероральних схемах введення перед парентеральною імунізацією офіційними дифтерійними вакцинами.

Список літератури

1. Алешина Р.М. Аллергические реакции как поствакцинальные осложнения [Текст] / Р.М. Алешина, Б.А. Ребров, В.В. Лейкина // Укр. журн. екстремальної медицини ім. Г.О. Можаяєва. - 2010. - Том 11, № 1. - С. 6-14.
2. Аллергия. Патологическая физиология [Электронный ресурс] / Под. ред. А.Д. Адо и Л.М. Ишимовой // М. : Медицина, 1980. - Режим доступа: http://pathophysiology.dsmu.edu.ua/study/books/ado/ado_1980_125_143_allergy_1.htm.
3. Брагинская В.П. Активная иммунизация и профилактика поствакцинальных осложнений у детей [Текст] / В.П. Брагинская, А.Ф. Соколова. - М. : Медицина, 1990. - 386 с.
4. Єлисеєва І. В. Імунологічна активність антигенних фракцій збудника дифтерії, одержаних за допомогою фізичних чинників [Текст] / І.В. Єлисеєва, Є.М. Бабич, Л.А. Ждамарова, В.І. Білозерський, І.В. Бобирева // Вісник проблем біології і медицини. - 2012. - № 1 (91). - С. 215-218.
5. 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, В.І. Білозерський, Т. В. Горбач, С.А. Колпак, І.В. Бобирева // Аналі Мечніковського інституту. - 2008. - № 3. - С. 25-31. Режим доступу: <http://www.imiamn.org.ua/journal.htm>.
6. 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, В.І. Білозерський, Т.В. Горбач, С.А. Колпак, І.В. Бобирева // Аналі Мечніковського інституту. - 2009. - № 2. - С. 58-66. Режим доступу: <http://www.imiamn.org.ua/journal.htm>.
7. Єлисеєва І.В. 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, С.А. Колпак, Н.І. Ігумнова, Т.А. Сидоренко, І.В. Бобирева // Аналі Мечніковського інституту. - 2009. - № 4. - С. 19-23. Режим доступу: <http://www.imiamn.org.ua/journal.htm>
8. Мельник В.А. Некоторые закономерности развития иммуно-патологических 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.
9. Bousquet J. Subcutaneous and local specific immunotherapy in perspective / J. Bousquet, F.B. Michel // Proceedings of XVI European Congress of Allergology and Clinical Immunology. - Madrid. - 1995. - P. 717-722. - Режим доступу: <http://nature.web.ru/db/msg.html?mid=1162230&uri=index3.html>.
10. Brandzaeg P. Basic mechanism of mucosa immunity - a major adaptive defense system / P. Brandzaeg // The Immunologist. - 1995. - № 3. - P. 89-96. Режим доступу: <http://nature.web.ru:8002/db/msg.html?mid=1162230&uri=index3.html>.
11. Cherkinsky C. The mucosal immune system and prospect for anti-infectious and antiinflammatory vaccines / C. Cherkinsky, J. Holmgren // The Immunologist. - 1995. - 3. - P. 97-103. Режим доступу: <http://nature.web.ru:8002/db/msg.html?mid=1162230&uri=index3.html>.

12. Daniel C. The European LABDEL project and its relevance to the prevention and treatment of allergies / C. Daniel, A. Repa, A. Mercenier, U. Wiedermann, J. Wells // *Allergy*. – 2007, Nov. – 62(11):1237-42. Режим доступу: www.ciiil.fr/page.asp?page=1387.
13. Durham S.R. Immunologic changes associated with allergen immunotherapy / S.R. Durham, S.J. Till // *Allergy Clin. Immunol.* – 1998. – Vol. 102. – №2. – P. 3-53. Режим доступу: www.fasebj.org/cgi/reprint/00-0767fjev1.pdf.
14. Foucard T. Allergen-specific IgE and IgG antibodies in pollen allergic children given immunotherapy for 2 to 6 years / T. Foucard, Sgo. Johansson // *Clin. Allergy*. – 1978. – № 8. – P. 249-259. Режим доступу: <http://www.nature.web.ru:8002/db/msg.html?mid=1162230&uri=index3.html>.
15. Halken S. New visions in specific immunotherapy in children: an iPAC summary and future trends / S. Halken, S. Lau, E. Valovirta // *Pediatr. Allergy Immunol.* – 2008, Aug; 19 Suppl 19:60-70. Режим доступу: www.allegriallergia.org/PAGINE/FILES/July_August_2008.pdf.
16. O'Hehir R.E. Sublingual allergen immunotherapy: immunological mechanisms and prospects for refined vaccine preparation / R.E. O'Hehir, A. Sandrini, G.P. Anderson, J.M. Rolland // *Curr. Med. Chem.* – 2007; 14(21):2235-2244. Режим доступу: <http://med.monash.edu.au/immunology/research/allergy-lab.html>.
17. Rodríguez-Pérez N. New types of immunotherapy in children / N. Rodríguez-Pérez, M. Penagos, J.M. Portnoy // *Curr. Allergy Asthma Rep.* – 2008, Nov; 8(6):484-492. Режим доступу: www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19482349.
18. Ulrich N. Oral und sublinguale hyposensibilisierung bei allergischen Atemwegserkrankungen [Електронний ресурс] / N. Ulrich, N. Bodo, R. Harald // *Pneumol. Immunol. Charite.* – Berlin. – 1998. – 95. – № 36. – P. 1713-1716. Режим доступу: <http://nature.web.ru:8002/db/msg.html?mid=1162230&uri=index3.html>.
19. WHO Position Paper. Allergen immunotherapy: therapeutic vaccines for allergic diseases [Електронний ресурс] // *Allergy*. – 1998. – Vol. 53. – Suppl. – P. 1-42. Режим доступу: www.svnp.es/Document/inmunoter.htm.

УДК 57.083.3:579.871.1:616-097

ВИВЧЕННЯ ДЕСЕНСИБІЛІЗУЮЧОЇ ДІЇ ОЧИЩЕНИХ АНТИГЕННИХ ФРАКЦІЙ ЗБУДНИКА ДИФТЕРІЇ, ОДЕРЖАНИХ ЗА ДОПОМОГОЮ ФІЗИЧНИХ ЧИННИКІВ

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

Резюме. В експерименті на лабораторних тваринах показана можливість попередження розвитку шкірних післявакцинальних алергічних реакцій на протидифтерійні вакцини шляхом попереднього парентерального введення очищених антигенних фракцій, одержаних за допомогою фізичних чинників з мікробних клітин *Corynebacterium diphtheriae* var. *gravis* токсигенний, massachusetts.

Ключові слова: вакцини проти дифтерії, *Corynebacterium diphtheriae*, антигенні фракції, шкірні алергічні реакції, десенсибілізуюча дія.

УДК 57.083.3:579.871.1:616-097

ИЗУЧЕНИЕ ДЕСЕНСИБИЛИЗИРУЮЩЕГО ДЕЙСТВИЯ ОЧИЩЕННЫХ АНТИГЕННЫХ ФРАКЦИЙ ВОЗБУДИТЕЛЯ ДИФТЕРИИ, ПОЛУЧЕННЫХ ПРИ ПОМОЩИ ФИЗИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ

Бабич Е.М., Елисеєва І.В., Ждамарова Л.А., Белозерский В.И., Бобырева И.В.

Резюме. В эксперименте на лабораторных животных показана возможность предупреждения кожных послевакцинальных аллергических реакций на противодифтерийные вакцины путем предварительного парентерального введения очищенных антигенных фракций, полученных из микробных клеток *Corynebacterium diphtheriae* var. *gravis* токсигенный, massachusetts, при помощи физических факторов.

Ключевые слова: вакцины против дифтерии, *Corynebacterium diphtheriae*, антигенные фракции, кожные аллергические реакции, десенсибилизирующее действие.

UDC 57.083.3:579.871.1:616-097

Study Of Desensitizing Activity Of Refined Diphtheriae Pathogen Antigens Fractions Obtained By Physical Agents

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

Summary. In laboratory animal experiments it's shown a possibility of dermal allergic reactions prevention on diphtheria vaccines by preliminary injections of refined antigenic fractions obtained from *Corynebacterium diphtheriae* var. *gravis* toxigenic, massachusetts, microbe cells by physical agents.

Key words: vaccines against diphtheria, *Corynebacterium diphtheriae*, refined antigenic fractions, dermal allergic reactions, desensitizing activity.

Стаття надійшла 8.05.2012 р.

Рецензент – проф. Лобань Г.А.