

DOI 10.29254/2077-4214-2018-1-1-142-252-256

УДК 615.371: 579.871.1:615.06

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

### МОЖЛИВІ ШЛЯХИ ПІДВИЩЕННЯ БЕЗПЕЧНОСТІ ДИФТЕРІЙНИХ ВАКЦИН

ДУ «Інститут мікробіології та імунології ім. І. І. Мечникова» (м. Харків)

[babych\\_em@ukr.net](mailto:babych_em@ukr.net)

**Зв'язок публікації з плановими науково-дослідними роботами.** Дана робота є фрагментом науково-дослідної роботи «Визначити вплив кашлюково-дифтерійних антигенів на клітинно-опосередований імунітет та обґрунтувати концептуальні положення створення вакцин у форсуючому режимі», № державної реєстрації 0117U002276.

**Вступ.** Вакцини для масштабного використання повинні відповідати вимогам якості, встановленим ВООЗ, бути безпечними та ефективними в усіх цільових групах населення, легко адаптуватися до календарів щеплень, відповідати загальним технічним вимогам, і мати відповідну ціну для різних ринкових умов. Вважається, що дифтерійний анатоксин відповідає усім цим умовам [22,23]. Проте ВООЗ визнає, що локальні прояви у місці ін'єкції дифтерійної вакцини (еритема, інфільтрат) спостерігаються часто, від 10% і навіть понад 50% щеплень, у залежності від кількості уведених попередніх доз, передвакцинального рівня анитоксину, дози анатоксину, комбінації з правцевим анатоксином та кашлюковою вакциною [22]. Вакцина АКДП залишається однією з провідних щодо показників реактогенності, ризик яких по частоті та важкості підвищується з кожною наступною бустер-дозою вакцини, починаючи з раннього підліткового віку [20].

По мірі скорочення циркуляції диких штамів патогенних бактерій під впливом лікувально-профілактичних заходів зростає необхідність у розробці імунобіологічних препаратів для компенсації природних бустер-процесів, оскільки періодичне антигенне стимулювання між плановими щепленнями є вирішальною умовою підтримання стабільного напруженого специфічного імунітету у щеплених осіб [10]. В якості таких вакцин найбільш перспективними є мукозальні вакцини для перорального і назального застосування, можливість створення яких досліджується і в Україні [3,4,6,14,16-19]. Вважається, що саме мукозальні вакцини стануть основним засобом профілактики багатьох інфекційних захворювань [13,21]. Перевага мукозальних препаратів обумовлена стимулюванням імунної відповіді у цілому і локально, у місцях вхідних воріт патогенів. Заміна парентерального способу щеплення на пероральний, який характеризується природністю, неінвазивністю, безболісністю, психологічно не травмує, є також одним з можливих шляхів зменшення реактогенності дифтерійної вакцини.

Анатомо-фізіологічною основою пероральної імунізації є імунна система шлунково-кишкового тракту – GALT (*англ. — gut associated lymphoid tissue*), яка містить 80% усіх імунокомпетентних клітин організму. Її структурними елементами є солітарні лімфоїдні фолікули, Пей'єрові бляшки, апендикс, мезентеріальні лімфатичні вузли. Вони забезпечують взаємодію між антиген-презентуючими клітинами і Т-лімфоцитами під контролем клітин імунологічної пам'яті [1]. На апікальній мембрані кишечного епітелію знаходяться Toll-подібні рецептори (*Toll-like receptors – TLR*), трансмембранні молекули, котрі належать до елементів уродженого імунного захисту кишечного епітелію. Функціями TLR-рецепторів у ШКТ є забезпечення толерантності до індигенної мікрофлори; зниження вірогідності алергічних реакцій; доставка антигену антиген-презентуючими клітинами; підвищення щільності поміжклітинних зв'язків; індукція антимікробних пептидів [8].

Через високоселективний фільтр слизової оболонки ШКТ – «епітеліальні отвори» – відбувається контрольований фізіологічний транспорт поживних речовин, вітамінів, солей, води, а також антигенів. Другим механізмом надходження антигенів з просвіту кишки є їх транспортовка через М-клітини, котрі розташовані над Пей'єровими бляшками, не мають мікроворсинок, але мають мікроскладочки (*M-microfolds*). Шляхом ендцитозу вони транспортують макромолекули через клітину, в процесі транспортовки відбувається оголення антигенних структур речовини, на базолатеральній мембрані здійснюється стимуляція дендритних клітин, і у верхній частині Пей'єрової бляшки антиген презентується Т-лімфоцитам. Антигени, що презентуються Т-хелперам і макрофагам, розпізнаються і, у випадку наявності на поверхні клітин відповідних антигену рецепторів, Th0-клітини трансформуються у Th1 або у Th2. Трансформація у Th1 супроводжується продукцією прозапальних цитокинів: IL-1, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , активізацією фагоцитозу, міграцією нейтрофілів, посиленням окиснювальних реакцій, синтезом IgA, усі ці реакції спрямовані на елімінацію антигену. Диференціровка у Th2 сприяє продукуванню протизапальних цитокинів: IL-4, IL-5, IL-10, зазвичай супроводжує хронічну фазу запалення з утворенням IgG, а також сприяє утворенню IgE з розвитком atopії. Вірогідно, при зниженні стимулюючого впливу бактеріальних антигенів, відбувається переключення диференціювання Th-лімфоцитів з Th1 (з продуку-

ванням IL-6, IL-12, IL-18, IFN- $\gamma$ , IgA) переважно на Th2 (з продукуванням IL-4, IL-10, IgG, IgE) [1,9].

В-лімфоцити в процесі відповіді GALT-системи трансформуються у плазматичні клітини і виходять з кишечника в мезентеріальні лімфовузли, а звідти через грудну лімфатичну протоку – у кров і далі до слизових оболонок різних органів: ротової порожнини, бронхів, сечостатевого шляхів, до молочних залоз. 80% лімфоцитів повертаються назад до кишечника (*англ. — homing*) [9].

В нормі домінуючим серед усіх класів імуноглобулінів, що синтезуються у кишечнику, є секреторний IgA (SIgA). Він, як килимом, покриває слизову оболонку і перешкоджає розвитку інфекційного процесу шляхом формування колонізаційної резистентності до заселення патогеном – приєднанню мікробів до епітелію, нейтралізує віруси, затримує проникнення у кров розчинних антигенів. Вакцини, нанесені на слизові оболонки, викликають розвиток місцевого імунітету з високим рівнем секреції імуноглобулінів класу IgA. М-клітини захоплюють переважно антигени в комплексі з IgA з наступною стимуляцією продукції IgA. На відміну від IgG, основного системного імуноглобуліну, SIgA зв'язує антигени на поверхні слизової оболонки, перешкоджаючи проникненню їх усередину організму і тим самим попереджує розвиток запалення [1,9].

Але мукозальні вакцини характеризуються слабкою імуногенністю, що обмежує їх використання рамками вакцин для бустер-імунізації. З метою підсилення протективної активності таких вакцин запропоновано ряд «мукозальних» ад'ювантів: термолабільний токсин *E. coli* та його численні мутантні форми, одержані методом сайт-спрямованого мутагенезу, токсин збудника холери, ліпопротеїни, мукопептиди, ліпополісахариди, олігонуклеотиди бактеріальної ДНК, сапонін, цитокіни [12-15,21]. Перспективність впровадження мукозальних ад'ювантів залежить від їх здатності зберігати толерантність кишечника до харчових алергенів, протективні антигени у поєднанні з ад'ювантом не повинні викликати аутоімунні реакції до клітин хазяїна.

Відмова від нейротоксичного ад'юванту гідроксиду алюмінію у дифтерійних вакцинах і заміна його на ад'ювант бактерійного походження відкриває можливість уникнути токсичної дії хімічної речовини, підвищити імуногенність дифтерійного анатоксину, стимулювати реакції Th1-клітинного захисту організму, сприяти активізації систем уродженого імунітету та антиколонізаційної резистентності [5,11].

**Мета дослідження.** Вивчення ефективності перорального щеплення лабораторних тварин нативним очищеним дифтерійним анатоксином та принципової можливості заміни у складі комбінованих дифтерійних вакцин хімічного ад'юванту гідроксиду алюмінію на ад'ювант бактерійного походження.

**Об'єкт і методи дослідження.** Експерименти проводилися на піддослідних тваринах – кролях середньою вагою до 3 кг. Усі тварини в ході експерименту отримували стандартний раціон віварію, мали відповідні умови утримання відповідно до рекомендацій в наступних документах [7]. Експериментальні дослідження було проведено з дотри-

мання вимог гуманного ставлення до піддослідних тварин, регламентованих Законом України «Про захист тварин від жорстокого поводження» (№ 3447-IV від 21.02.2006 р.) та Європейською конвенцією про захист хребетних тварин, які використовуються для дослідних та інших наукових цілей (Страсбург, 18.03.1986 р.).

Кролів вакцинували монопрепаратами нативного очищеного дифтерійного анатоксину (НОДА) та дифтерійної вакцини АД-М виробництва ПАТ «Фармстандарт-Біолік», експериментальними комбінованими вакцинними препаратами, які містили бактерійні антигени, виготовлені з музейних культур *C. pseudodiphtheriticum*, *C. diphtheriae* var. *mitis* tox<sup>-</sup>, *C. diphtheriae*, var. *gravis*, tox<sup>+</sup>, за допомогою ультразвукової дезінтеграції мікробних клітин за авторським методом [8].

Одержання антигенних препаратів з мікробної маси *C. diphtheriae* відбувалося за принциповою схемою, яка складалася з наступних етапів: (1) добову агарову культуру *C. diphtheriae* змивали фізіологічним розчином, готували мікробну завись; (2) інактивували її та перевіряли відсутність росту коринебактерій; (3) тричі відмивали мікробні клітини фізіологічним розчином; (4) ресуспендували 20%-им сольовим розчином; (5) відмивали фізіологічним розчином; (6) мікробну завись піддавали обробці ультразвуком; (7) розділяли супернатант і осад шляхом центрифугування; (8) супернатант фільтрували скрізь міліпорові фільтри «Владіпор».

Пероральна імунізація здійснювалася натщесерце через зонд у загальній дозі 600 Lf за один прийом або роздібно за декілька прийомів; підшкірно вводилось 20 Lf препарату. Вибір високої пероральної дози був пов'язаний з необхідністю подолання препаратом середовища шлункового бар'єру. Антигенну дію досліджуваних препаратів досліджували за допомогою РПГА. Аналіз даних серологічного дослідження проводився по середнім геометричним рівням антитіл у серопозитивних кролів.

**Результати дослідження та їх обговорення.** Перший етап досліджень був присвячений визначенню результативності пероральної вакцинації монопрепаратом НОДА (перша група тварин) у порівнянні з парентеральним (підшкірним) шляхом введення вакцини (друга група тварин). Кролів імунізували двічі. Слід зазначити, що під час спостереження усі тварини були жвавими, активно споживали їжу. Щотижневі дані РПГА представлені у **таблиці 1**.

Порівняння перорального та підшкірного способів введення нативного очищеного дифтерійного анатоксину по результатам визначення титрів антитоксичних антитіл після первинної та повторної вакцинації показало, що пероральна вакцинація на першому-другому тижні вже при першому введенні вакцини виявилася істотно ефективнішою, ніж підшкірний шлях: титри антитоксичних антитіл, відповідно, були у 8 та 5,6 разів більшими (**табл. 1**). Максимальний рівень антитіл при первинному пероральному введенні НОДА був досягнутий на другому тижні після щеплення – 0,17, а при підшкірному введенні – на четвертому тижні – 0,06 МО/мл.

При повторному введенні НОДА перевага перорального шляху введення стала ще виразнішою: з другого тижня рівні антитоксичних антитіл відрізнялися у понад 100 разів. Максимальні показники гуморального імунітету проти дифтерії зареєстровано на другому-третьому тижні – 21,3 та 16,0, відповідно. В той же час підшкірне введення НОДА дало можливість одержати максимальний рівень антитіл – 6,4 на першому тижні після повторного щеплення, а надалі титри антитіл знижувалися з 0,2 до 0,06.

Якщо в першому досліді для вакцинації кролів використовувався нативний очищений дифтерійний анатоксин, який не містив мінерального ад'юванту алюмінію, і рівень гуморального імунітету після парентерального введення вакцини виявився взагалі невисоким, то в подальшому експерименті підшкірне щеплення офіційною вакциною АД-М, сорбованою на гідроксиді алюмінію (у дозі 20 Лf/мл), вже з другого тижня дало надвисокі титри антитоксичних антитіл – 64,0 МО/мл (контроль) Потужна дія мінерального ад'юванту в цілому нівелювала можливий вплив досліджуваних бактерійних антигенів різного походження як можливих кандидатів у ад'юванти на рівень гуморального імунітету: титри антитіл у дослідній групі на другому-третьому тижнях дорівнювали контролю (табл. 2).

Але слід відзначити, що на першому тижні рівень антитіл у контролі у 16 разів перевищував титри, що сформувалися під дією комбінованих експериментальних препаратів – 0,06 МО/мл. З четвертого тижня ситуація змінилася, і титри антитіл в дослідній групі значно перевищували контрольний рівень.

Для подальшого вивчення ад'ювантної дії бактеріальних антигенів було використано препарат НОДА, вільний від мінерального ад'юванту, і взятий у зменшеній у 10 разів (2 Лf) дозі, у поєднанні з бактерійними антигенними препаратами, виготовлені з культури *S. diphtheriae*, var. *gravis*, tox+ (табл. 3).

До складу експериментальних комбінованих вакцин було взято препарати поверхневих антигенів клітинної стінки *S. diphtheriae* різної міри очищення: ультразвуковий дезінтеграт мікробних клітин збудника дифтерії (ДЗ), нативний супернатант (СН) та фільтрований через фільтри «Владіпор» (СН-ф). Максимальні титри антитіл було одержано при використанні в якості ад'юванта нативного препарату ДЗ – від 2,0 до 0,25 МО/мл. Розведення нативного ад'юванту у 2,5 рази теж дало достатньо високі титри антитіл – від 0,5 до 2,0 МО/мл. Очищення досліджуваного антигенного препарату за допомогою

Таблиця 1.

**Динаміка титрів антитоксичних антитіл у тварин, вакцинованих НОДА при пероральному та парентеральному введенні препарату**

№ п/п	Шляхи і дози введення НОДА	Дані РПГА, МО/мл			
		7-й	14-й	21-й	28-й
1	Первинне введення <i>per os</i> , 600 Лf	0,08	0,17	0,01	0
2	Повторне введення <i>per os</i> , 600 Лf	10,7	21,3	16,0	8,0
3	Первинне п/ш введення НОДА, 20 Лf	0,01	0,03	0,05	0,06
4	Повторне п/ш введення НОДА, 20 Лf	6,4	0,2	0,08	0,06

Таблиця 2.

**Динаміка даних РПГА при парентеральній вакцинації кролів АД-М вакциною із додаванням досліджуваних мікробних ад'ювантів**

№ п/п	Ад'ювант	Рівень антитіл, МО/мл			
		7 днів	14 днів	21 день	28 днів
К	-	1,0	64,0	64,0	64,0
1	<i>S. pseudodiphtheriticum</i>	0,06	64,0	64,0	>>64,0
2	<i>S. diphtheriae</i> var. <i>mitis</i> tox	0	64,0	64,0	>>64,0
3	<i>S. pseudodiphtheriticum</i>	0,06	64,0	64,0	>>64,0

Таблиця 3.

**Ад'ювантна дія бактеріальних антигенів при парентеральному щепленні кролів зменшеною дозою НОДА**

№ п/п	Вакцина	Дані РПГА, МО/мл			
		7-й	14-й	21-й	28-й
1	0,33 мл НОДА (2 Лf) + 1,0 мл ДЗ	2,0	1,0	1,0	0,25
2	0,33 мл НОДА (2 Лf) + 1,0 мл ДЗ (розв. в 2,5 рази)	0,5	2,0	0,5	0,5
3	НОДА 0,33 мл (2 Лf) + 1,0 мл СН	1,0	0,5	0,25	0,125
4	НОДА 0,33 мл (2 Лf) + 1,0 мл СН-ф	0,125	0	0	0
К	НОДА 0,33 мл (2 Лf)	0	0	0	0
	Середня геометрична рівнів антитіл у серопозитивних кролів	0,6	1,0	0,5	0,25

центрифугування виявилось не менш результативним, оскільки рівні антитіл у тварин, щеплених із застосуванням даного ад'юванту перевищували рекомендований захисний рівень 0,1 МО/мл у 2,5-10 разів. Лише у випадку застосування найбільш очищеного фільтрованого антигенного препарату на першому тижні після щеплення дало швидкоплинне підвищення титрів антитіл до рівня 0,125 МО/мл. В контролі, при підшкірному введенні монопрепарату НОДА (2 Лf), сероконверсії впродовж всього строку спостереження не відбулося.

Середня геометрична титрів антитіл у серопозитивних кролів, за даними РПГА, одержаними на першому, другому і третьому тижнях після щеплення, істотно (понад 2 та більше разів) перевищувала загальноприйнятій захисний рівень (0,1 МО/мл) (табл. 3).

**Висновки**

1. Пероральний спосіб імунізації нативного очищеного дифтерійного анатоксину при введенні бустер-дози виявився істотно ефективнішим за під-

шкірний спосіб введення препарату: титри антитіл у кролів набагато перевищували захисний рівень 0,1 МО/мл.

2. Комбінація АД-М вакцини з різними бактерійними антигенами (*C. pseudodiphtheriticum*, *C. diphtheriae* var. *mitis tox<sup>-</sup>*) призвела до сповільнення формування гуморального імунітету на першому тижні після щеплення у порівнянні з контролем та

появи надвисоких титрів антитіл з четвертого тижня, котрі перевищували контрольний рівень.

3. Зменшення дози НОДА у 10 разів (до 2 Lf) дало можливість показати ефективну ад'ювантну дію бактерійних антигенних препаратів *C. diphtheriae*, var. *gravis*, *tox<sup>+</sup>* різної міри очищення при підшкірному шляху щеплення і відповідну динаміку гуморальних антитіл.

### Література

1. Aleksandrova VA. *Osnovy ymmunnoi systemy zheludochno-kyshechnoho trakta*. SPb: MALO; 2006. 44 s. [in Russian].
2. Babych YeM, Yelyseieva IV, Bilozerskyi VI, Zhdamarova LA, Isaenko OYu, Bobyrieva IV, Horbach TV, vynakhidnyky; Derzhavna ustanova «Instytut mikrobiolohiyi ta imunolohiyi im. I. I. Mechnykova NAMN Ukrainy», patentovlasnyk. Sposib otrymannia bakteriinoho dyfteriinoho antyheny. № 86891 UA. 2014 Sich 10. [in Ukrainian].
3. Babych YeM, Yelyseieva IV, Zhdamarova LA, Bilozerskyi VI, Bobyrieva IV. Vyvchennia vplyvu peroralnoho vvedennia antyhenykh preparativ zbudnyka dyfterii na rozvytok kozhnoi reaktsii u kroliv. *Annals of Mechnikov Insitute*. 2013;1:40-3. [in Ukrainian].
4. Babych YeM, Yelyseieva IV, Zhdamarova LA, Bilozerskyi VI, Isaenko OYu, Bobyrieva IV. Vplyv peroralnoho vvedennia kashliukovykh antyhenykh preparativ na dermonekrotychnu reaktsiiu u kroliv. *Annals of Mechnikov Insitute*. 2013;1:51-7. [in Ukrainian].
5. Ielyseieva IV, Babych YeM, Bilozerskyi VI, Zhdamarova LA, Kolpak SA. Nehatyvni efekty, indukovani adiuvantamy vaktsyn. *Aktualni problemy suchasnoi medytsyny*. 2016;16(54 Ch. 2):279-86. [in Ukrainian].
6. Ielyseieva IV, Babych YeM, Skliar NI, Volianskyi YuL, Bilozerskyi VI, Zhdamarova LA, ta in. Perspektivy zastosuvannia peroralnykh shcheplen proty dyfterii. *Medytsyna sohodni i zavtra*. 2007;3:139-43. [in Ukrainian].
7. Kozhemiakin YuM, Khromov OS, Filonenko MA, Saifetdinova HA. *Naukovo-praktychni rekomendatsii utrymannia laboratornykh tvaryn ta roboty z nymy*. K.: Ministerstvo okhorony zdorovia Ukrainy, derzhavnyi farmakolohichnyi tsentr; 2002. 155 s. [in Ukrainian].
8. O roly antymykrobnykh peptydov v mekhanizmach vrozhdennoho ymmunyeta kyshechnyka cheloveka. [Redaktsyonnaia statia]. *Klynycheskye perspektivy gastroenterolohyy, hepatolohyy*. 2004;3:2-10. [in Russian].
9. Rush K, Petere U. Kyshechnyк – tsentr upravleniya ymmunnoi systemoi. *Byolohycheskaia medytsyna*. 2003;3:4-9. [in Russian].
10. Bader MS, McKinsey DS. Postexposure prophylaxis for common infectious diseases. *Am Fam Physician*. 2013;88(1):25-32.
11. Esposito S, Prada E, Mastrolia MV, Tarantino G, Codecà C, Rigante D. Autoimmune/inflammatory syndrome induced by adjuvants (ASIA): clues and pitfalls in the pediatric background. *Immunol. res*. 2014;60(2-3):366-75.
12. Garcon N, Geert Leroux-Roels, Wen-Fang Cheng. Vaccine adjuvants. *Perspectives in Vaccinology*. 2011;1:89-113.
13. Hasegawa H, van Reit E, Kida H. Mucosal Immunization and Adjuvants. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2015;386:371-80.
14. Khan A, Singh S, Galvan G, Jagannath C, Sastry KJ. Prophylactic Sublingual Immunization with Mycobacterium tuberculosis Subunit Vaccine Incorporating the Natural Killer T Cell Agonist Alpha-Galactosylceramide Enhances Protective Immunity to Limit Pulmonary and Extra-Pulmonary Bacterial Burden in Mice. *Vaccines (Basel)*. 2017;5(4):47-52.
15. Nakao R, Hasegawa H, Dongying B, Ohnishi M, Senpuku H. Assessment of outer membrane vesicles of periodontopathic bacterium *Porphyromonas gingivalis* as possible mucosal immunogen. *Vaccine*. 2016;34(38):4626-34.
16. Niven R. Prospects and challenges: inhalation delivery systems. *Therapeutic Delivery*. 2013;4(5):519-22.
17. Nizard M, Diniz MO, Roussel H, Tran T, Ferreira LC, Badoual C, et al. Mucosal vaccines: Novel strategies and applications for the control of pathogens and tumors at mucosal sites. *Hum Vaccin Immunother*. 2014;10(8):2175-87.
18. Patel H, Yewale C, Rathi MN, Misra A. Mucosal immunization: a review of strategies and challenges. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst*. 2014;31(4):273-303.
19. Reis CP, Silva C, Martinho N, Rosado C. Drug carriers for oral delivery of peptides and proteins: accomplishments and future perspectives. *Therapeutic Delivery*. 2013;4(2):251-65.
20. Scheifele DW, Ochnio JJ, Halperin SA. Cellular immunity as a potential cause of local reactions to booster vaccination with diphtheria and tetanus toxoids and acellular pertussis antigens. *Pediatr Infect Dis J*. 2009;28(11):985-89.
21. Ulmer JB, Valley U, Rappuoli R. Vaccine manufacturing: challenges and solutions. *Nat Biotechnol*. 2006;24(11):1377-83.
22. WHO position paper. Vaccine against diphtheria. *Weekly Epidemiological Record*. 2006; 3.
23. World Health Organization. GVP policy statement. Statement on vaccine quality. WHO/VSQ/GEN/96.02 REV. 1996; 1.

### МОЖЛИВІ ШЛЯХИ ПІДВИЩЕННЯ БЕЗПЕЧНОСТІ ДИФТЕРІЙНИХ ВАКЦИН

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

**Резюме.** Стаття присвячена розробці підходів до підвищення безпечності дифтерійних вакцин шляхом застосування пероральної бустер-імунізації та заміни ад'юванту гідроксиду алюмінію на бактерійний антиген. Перевага мукозальних препаратів обумовлена стимулюванням імунної відповіді у цілому і локально, у місцях вхідних воріт патогенів, зменшенням реактогенності завдяки природному шляху введення. Відмова від гідроксиду алюмінію у дифтерійних вакцинах і заміна його на ад'ювант бактерійного походження відкриває можливість уникнути нейротоксичної та аутоімунної дії хімічної речовини, підвищити імуногенність дифтерійного анатоксину, стимулювати реакції Th1-клітинного захисту організму, сприяти активізації систем уродженого імунітету та антиколонізаційної резистентності.

Піддослідних кролів вакцинували препаратами нативного очищеного дифтерійного анатоксину, дифтерійної вакцини АД-М, експериментальними комбінованими вакцинними препаратами, які містили бактерійні антигени, виготовлені з музейних культур *C. pseudodiphtheriticum*, *C. diphtheriae* var. *mitis tox<sup>-</sup>*, *C. diphtheriae*, var. *gravis*, *tox<sup>+</sup>* за допомогою ультразвукової дезінтеграції мікробних клітин за авторським методом. По даним РПГА із сироватками крові щеплених кролів, показано, що пероральний шлях вакцинації дає можливість одержати

набагато більш напружений гуморальний захист у порівнянні з підшкірним щепленням навіть при первинній імунізації. Продемонстровано ефективну ад'ювантну дію препаратів поверхневих антигенів клітинної стінки *C. diphtheriae* різної міри очищення при введенні їх до складу НОДА.

**Ключові слова:** дифтерійні вакцини, безпечність, пероральна імунізація, ад'юванти, бактерійний антиген.

### ВОЗМОЖНЫЕ ПУТИ ПОВЫШЕНИЯ БЕЗОПАСНОСТИ ДИФТЕРИЙНЫХ ВАКЦИН

**Елисеева И. В., Бабич Е. М., Ждмарова Л. А., Белозерский В. И., Колпак С. А.**

**Резюме.** Статья посвящена разработке подходов к повышению безопасности дифтерийных вакцин путем применения пероральной бустер-иммунизации и замены адьюванта гидроксида алюминия на бактериальный антиген. Преимущества мукозальных препаратов обусловлены стимулированием иммунного ответа в целом и локально, в местах входных ворот патогенов, уменьшением реактогенности благодаря природному пути введения. Отказ от гидроксида алюминия в дифтерийных вакцинах и замена его на адьювант бактериального происхождения открывает возможность избежать нейротоксического и аутоиммунного действия химического вещества, повысить иммуногенность дифтерийного анатоксина, стимулировать реакции Th1-клеточной защиты организма, содействовать активизации систем врожденного иммунитета и антиколониционной резистентности.

Подопытных кролей вакцинировали препаратами нативного очищенного дифтерийного анатоксина, дифтерийной вакциной АД-М, экспериментальными комбинированными вакцинными препаратами, которые содержали бактериальные антигены, полученные из музейных культур *C. pseudodiphtheriticum*, *C. diphtheriae* var. *mitis* tox-, *C. diphtheriae*, var. *gravis*, tox+ при помощи ультразвуковой дезинтеграции микробных клеток авторским способом. По данным РПГА с сыворотками крови привитых кролей показано, что пероральный путь вакцинации дает возможность получить гораздо более напряженный гуморальный иммунитет по сравнению с подкожной прививкой даже при первичной иммунизации. Продемонстрировано эффективное адьювантное действие препаратов поверхностных антигенов клеточной стенки *C. diphtheriae* разной степени очистки при введении их в состав НОДА.

**Ключевые слова:** дифтерийные вакцины, безопасность, пероральная иммунизация, адьюванты, бактериальный антиген.

### POSSIBLE WAYS TO IMPROVE THE SAFETY OF DIPHTHERIAL VACCINES

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

**Abstract.** Existing diphtheria vaccines cause local reactions (erythema, infiltration) from 10% and over 50% of vaccinations, the risk of which in frequency and severity increases with each subsequent booster dose of the vaccine, from early adolescence. The article is devoted to the development of approaches to increasing the safety of diphtheria vaccines by using oral booster immunization and replacement of the chemical adjuvant of aluminum hydroxide by bacterial antigen. The advantages of mucosal preparations are due to the stimulation of the immune response in general and locally, at the entrance gate of pathogens. Replacing the parenteral method of immunization with oral, which is characterized by naturalness, non-invasiveness, painlessness, does not psychologically traumatize, is also one of the possible ways to reduce the reactogenicity of the diphtheria vaccine. The refusal of the adjuvant of aluminum hydroxide in diphtheria vaccines and its replacement by an adjuvant of bacterial origin opens the possibility of avoiding the neurotoxic and autoimmune action of the chemical, increasing the immunogenicity of diphtheria toxoid, stimulating the Th1-cell defense of the organism, promoting the activation of innate immunity systems and anti-colonization resistance.

Experimental rabbits were vaccinated with mono-preparations of native purified diphtheria toxoid (NPDT) and diphtheria vaccine AD-M, experimental combined vaccine preparations that contained bacterial antigens obtained from museum cultures *C. pseudodiphtheriticum*, *C. diphtheriae* var. *mitis* tox-, *C. diphtheriae*, var. *gravis*, tox+ by means of ultrasonic disintegration of microbial cells according to the author's method. According to the RPHA with blood sera of rabbits vaccinated with the drugs studied, it has been shown that the oral route of vaccination makes it possible to obtain much more intense humoral immunity in comparison with subcutaneous vaccination even with primary dose of vaccine: the titers of antitoxic antibodies in the first-second week, respectively, were 8 and 5.6 times higher. The maximum level of antibodies in the initial oral administration of NPDT was obtained on the second week after inoculation – 0.17 IU/ml, and with subcutaneous administration – in the fourth week – 0.06 IU/ml. With the reintroduction of the NPDT, the advantage of the oral route of immunization became even more apparent: from the second week the levels of antitoxic antibodies differed by more than 100 times. The maximum titre of humoral immunity against diphtheria were revealed in the second and third week – 21.3 and 16.0 IU/ml, respectively. At the same time, the subcutaneous administration of the NPDT made it possible to obtain the maximum level of antibodies – 6.4 IU/ml in the first week after repeated vaccination, and then the antibody titers decreased from 0.2 to 0.06 IU/ml. The effective adjuvant effect of preparations of surface antigens of the *C. diphtheriae* cell wall of different degree of purification upon their introduction into the NPDT was demonstrated. The average geometric titres of antibodies in seropositive rabbits, according to the RPHA, obtained at the first, second and third weeks after vaccination, significantly exceeded the conventional protective level (0.1 IU/ml) by more than 2 times. In the control, with subcutaneous administration of the drug NODA (2 Lf), seroconversion did not occur during the whole experimental observation period.

**Key words:** diphtheria vaccines, safety, oral immunization, adjuvants, bacterial antigen.

Рецензент – проф. Лобань Г. А.  
Стаття надійшла 22.01.2018 року