биоцидной активности дезинфектанта содержащего полигексаметиленгуанидин / Н.С. Мандыгра, А.В. Лисица, И.В. Степаняк, Ю.Н. Мандыгра, А.М. Дъяченко // Совр. проблемы диагн., лечения и проф. инфекц. болезней животных и птиц: Сб. науч. трудов. Вып. 2. – Екатеринбург: Уральское издат., 2008. – С. 318-322. ***4.*** www.iet.biocide.ry ***5.*** Книрель, Ю.А. Строение липополисахаридов грамотрицательных бактерий / Книрель Ю.А., Кочетков Н.К. // Биохимия. – 1993. – Т.58, № 2. – С. 166-181. ***6.*** Біохімічні аспекти біоцидної дії полімерних похідних гуанідину / М.С. Мандигра, А.В. Лисиця, І.Л. Андрущук, Ю.М. Мандигра-Мельник // Вісник Білоцерківського державного аграрного університету: Зб. наук праць. – Біла Церква, 2009. – Вип. 60. – Ч. 1. – С. 81-85. ***7.*** Кузнецова, Л.С. О механизме действия полигуанидиновых дезинфектантов // Мясная индустрия. – 2001. – № 4. – С. 16-19. ***8.*** Константиновская, С.В. Исследование действия биоцидов (на примере ПГМГ) на эколого-функциональное состояние водоросли *Chlorella pyrenoidosa*: автореф. дис. канд. биол. наук: спец. 03.00.16. «Экология» / С.В. Константиновская. – Москва, 2006. – 20 с.

MOLECULAR MECHANISMS OF THE INFLUENCE OF DISINFECTANT ON THE BASE OF *POLYHEXAMETHYLENEGUANIDINE* ON THE CELL MEMBRANES

Mandygra M.S., Lysytsya A.V.

Epizootology Institute of UAAS, Rivne

Shaturskiy O.Ya.

Biochemistry Institute of NASU, Kyiv

Polyhexamethyleneguanidine (PGMG) is the main component of the new disinfectant Epidez. The article presents the results of the study of the influence of different concentrations of PGMG on ion conductivity through double layer phospholipid membrane. It is a model of the nature membrane of microorganism. It has been esteblished that minimum acting concentration of the preparation is 2Ч10^{-5} %. We have established that interaction of the molecules of PGMG with lipid double layer has the inconvertible nature.

УДК 577.11.542.951,1:615,281:615.23.73

ТЕХНОЛОГІЧНІ АСПЕКТИ КОНСТРУЮВАННЯ ВАКЦИН ДЛЯ МЕДИЦИНИ ТА ВЕТЕРИНАРІЇ НА ОСНОВІ АЦИЛЬОВАНИХ ПОХІДНИХ ІМУНОГЕННИХ БІОПОЛІМЕРІВ P.AERUGINOSA

Мартинов А.В., Волянська Н.П.

ДУ «Інститут мікробіології та імунології ім. І.І. Мечникова АМН України»

Отримано сукцинильовані похідні антигенних білків синьогнійної палички з різним ступенем модифікації, визначено їх найбільш імуногенні варіанти з метою подальшої розробки лікарських форм імунобіологічних препаратів для трансдермального і перорального застосування в гуманній та ветеринарній медицині.

На сьогодні існує достатньо великий арсенал засобів специфічної профілактики інфекційних захворювань – вакцин, імуноглобулінів тощо, деякі з них вже дозволили людству майже подолати окремі пандемічні хвороби (натуральна віспа, поліомієліт), інші проявляють вельми високу ефективність при широко розповсюджених хворобах людей і тварин (кліщовий енцефаліт, дифтерит, кір, правець, сказ та ін.). Однак, поки що немає ефективних засобів специфічної профілактики щодо широко розповсюджених (лістеріоз, мікоплазмози, уреоплазмози, хламідіози, псевдомонози, малярія та фактично всі паразитози, ентеробактеріози і др.) та якби екзотичних, але які в останні десятиріччя агресивно себе проявили в глобальному масштабі (СНІД, віруси груп герпесу, адено-, рота-, енцефалопатії, пташиний грип, SARS) захворювань. В одних випадках неспроможність конструювання надійних імунобіологічних засобів обумовлена низькою імуногенністю антигенів збудника, в інших - неспецифічністю імунної відповіді, що пояснюється вираженим поліморфізмом антигенів, гетерогенністю та популяційною мінливістю збудників [1, 2]. Пошук но-

вих методологічних та методичних підступів щодо підвищення імуногенності вакцинних антигенів та засобів інтенсифікації продукції антигенних детермінант є чи найактуальнішою проблемою сучасної інфектології, а також вакцинології, ветеринарної та медичної мікробіології, молекулярної біології, генетики, фармакології і фармації [3-5].

Метою роботи означено конструювання сукцинильованих похідних антигенних білків P. aeruginosa з різним ступенем модифікації та визначення з них найбільш імуногенних варіантів (для подальшої розробки на їх основі пероральних та трансдермальних вакцин проти псевдомонозів). У процесі досягнення мети вирішено наступні задачі: вилучено розчинні білково-полісахаридні комплекси (БПК) ізолятів синьогнійної палички, препаративно їх розщіплено, шляхом ацилювання окремих компонентів суміші БПК отримано варіанти за ступенем ацилювання, доведено наявність імуногенності перспективних кандидатів для створення вакцин, сконструйовано лікарські форми пероральних та трансдермальних протисиньогнійних специфічних імунобіологічних препаратів (з використанням карбополу та моно- і поліламелярних ліпосом).

Методи дослідження. Конструювання ацил-протеїдів реалізовано за власними оригінальними методиками з використанням для ацилювання лізинових аміногруп, треонінових та тирозинових гідроксильних груп з подальшим виявленням надлишкового негативного заряду модифікованих білків за методом FPLC (Fast Liquid Chromatography) фірми Pharmacia при застосуванні моно- Q аніонообмінної колонки [6].

Молекулярну масу та частоти ацил-протеїдів встановлювали загальновідомим методом капілярного горизонтального гель-електрофорезу з використанням біоаналізатора Agilent-2100 та набору специфічних стандартів. Частину білків готували препаративно, для чого гель не забарвлювали, а робили з нього «відбитки» на нітроцелюлозному папері (рис. 1).

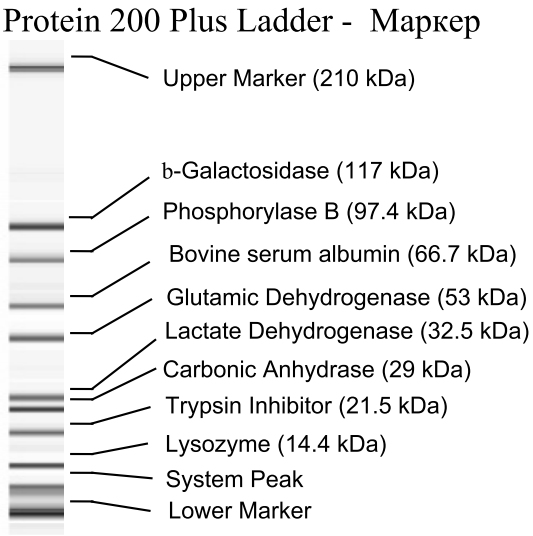


Рис. 1. Стандарти, які використано при дослідженнях на біоаналізаторі Agilent-2100

Розподіл ацил-протеїдів проводили за допомогою гельфільтрації, одночасно визначали та підтверджували попередньо розраховану молекулярну масу [7]. Стандартизацію ацилпептидів виконували шляхом пептидного картування за продуктами їх ферментативного гідролізу [8] в умовах, які наведено в табл. 1.

Таблиця 1 – Умови проведення двомірного картування ацилпептидів, які утворюються після гідролізу дослідного пептиду

pH буферу	Компоненти буферного розчину	Співвідно-шення компонентів (мл)	Напруга для електрофорезу, В	Час проведення електрофо-резу, хв
Перший напрямок - електрофорез				
3,5	Піридин: оцтова кислота: вода	2:20:978	1000	45
6,5	Піридин: оцтова кислота: вода	100:3:897	1000	40
4,7	Бутанол: піридин: оцтова кислота: вода	2:1:1:18	1000	45
Другий напрямок*: хроматографія за температури 25 ^{0}C				
7,8	Хлороформ: мета-нол: аміак	2:2:1	-	-
8,2	Пропанол: аміак	7:3	-	-
5,3	Бутанол: піридин: оцтова кислота: вода	97: 75: 15: 60	-	-

*Примітка: * - проводили тільки у випадках, коли спостерігалася розмита чи довга смуга.*

Ступінь імуногенності різних варіантів ацильованих білків P. aeruginosa (білково-полісахаридні комплекси мікробної стінки, корпускулярні антигени) досліджували за загальноприйнятими методами in vivo [9-10], титри антисиньогнійних антитіл визначали імунофлуорометричним методом [11].

Водорозчинний мурамілпептидний високомолекулярний сукцинильований антиген P. aeruginosa отримували за власною методикою з використанням колонки G-75. Ступінь ацилювання мурамілпептидного антигену перед введенням в ліпосоми доводили поступово (1 %, 5 %, 11 %) до 15 %.

Фосфотидилхінолінові ліпосоми з мурамілпептидним антигеном досліджували методом прискореного старіння за умов підвищенного ступеню окислення (визначали наявність тіобарбітурат-активні аддукти перекисного окислення ліпідів – ТАПОЛ). Гідрогелі з ацильованим антигеном синьогнійної палички на карбополовій основі конструювали з використанням 10 % суспензії ліпосом та консерванта бензалконію хлориду (0,1 %).

Нами доведено раніше [12], що навіть часткове ацилювання білків призводить до значного підвищення їх імуногенності. Фактично все залежить від заряду білкової (полісахаридної) молекули, що математично змодульовано [13]. В якості моделі для дослідження різних варіантів сукцинильованих вакцин використано синьогнійний мурамілпептидний антиген з молекулярною масою 1,1-1,5 мДа. Структура мурамілпептиду достатньо вивчена, встановлена його молекулярна маса. Вакцини з таких полісахаридів імуногенні і вже використовуються, та все ж таки обмежено, в медичній та ветеринарній практиці.

Часткове ацилювання збільшує гідрофільність молекули та її заряд, що дає змогу імуноцитам розпізнати більше епітопів у структурі молекули ацил-полісахариду, а ніж у нативній речовині.

Фізико-хімічні властивості сукциніл- антигену надано у табл. 2.

Вочевидь, що коливання між розрахованими та встановленими масами сукцинильованих похідних атигену незначні та потрапляють у довірчий інтервал.

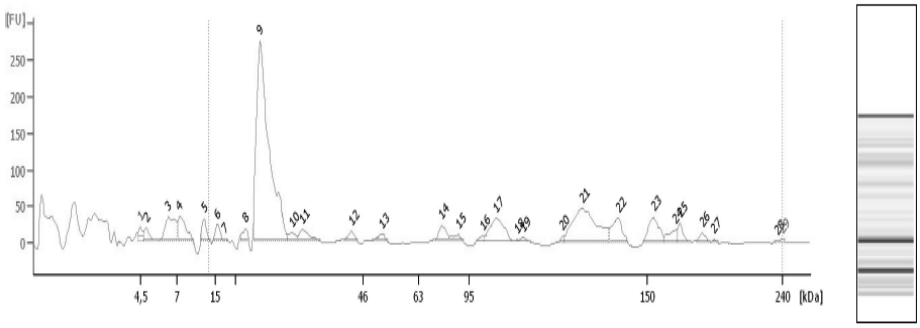
При висушуванні тільки варіанти з 70 та 100 % ступінню ацилювання кристалізуються з утворенням голковидних кристалів (інші варіанти кристалізуються з утворенням плівки). Варіант із 100 % ацилюванням не дає характерної реакції на полісахариди із фенол-сірчаним реактивом, хоч і стало проявляється на хроматограмі карміном.

Таблиця 2 – Фізико-хімічні властивості похідних синьогнійного антигену

№ п/п	Варіант антигену, % ацилювання	Rf	Розраховано Mr, kDa	Встановлено Mr, kDa	Форма кристалів
1	1	0,34	1160,6 ± 5,5	1210,0 ± 5,2	-
2	3	0,32	1190,0 ± 5,5	1220,0 ± 5,5	-
3	7	0,29	1230,6 ± 5,5	1250,5 ± 5,5	-
4	10	0,25	1270,0 ± 5,5	1310,0 ± 5,5	-
5	20	0,20	1380,6 ± 5,5	1400,0 ± 5,5	-
6	30	0,18	1500,1 ± 5,5	1520,5 ± 5,5	-
7	50	0,15	1730,2 ± 5,5	1690,5 ± 5,5	-
8	70	0,10	1960,3 ± 7,5	1980,0 ± 7,5	голковидна
9	100	0,08	2310,0 ± 7,5	2350,0 ± 7,5	голковидна
10	нативний антиген	0,36	-	1150,5 ± 5,5	-

На рис. 2 подано хроматограму розділу компонентів високомолекулярного синьогнійного антигену після повної очистки на біоаналізаторі Agilent-2100 (з фракціонування виключено мурамілпептид з масою 1,5 мДа).

Основну фракцію очищеного антигену (смуга № 9) складає високомолекулярний глікопротеїд з молекулярною массою 31,5 кДа. Інші білки знаходяться в значно менших концентраціях. Серед значимих для проявлення імуногенних властивостей також можна обрати речовини зі смуг поглинання № 17 (з масою 103,4 кДа) та № 21 (з масою 129,9 кДа), але їх концентрація значно менша (2000-6000 нг/мкл) концентрації основної діючої речовини (35746 нг/мкл).



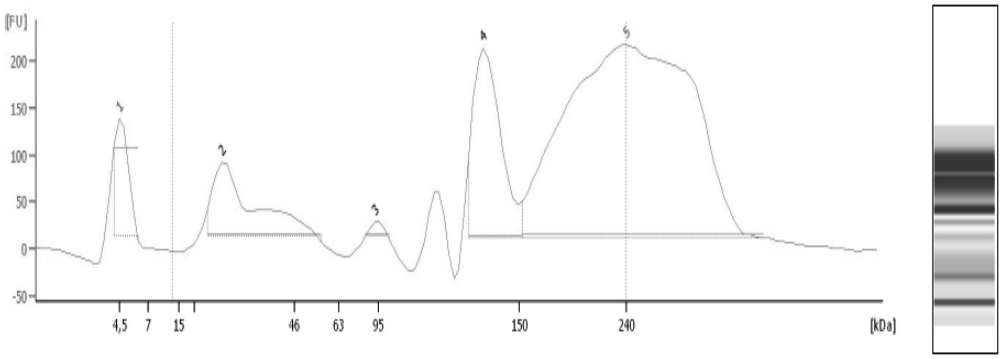
Peak	Size [kDa]	Rel. Conc. [ng/µl]
2	4,9	0,0
3	6,4	0,0
4	7,5	0,0
5	12,6	0,0
6	16,3	1 333,1
7	20,7	72,0
8	29,4	920,7
9	31,5	35 746,3
10	35,9	763,9
11	37,4	1 545,9
12	44,5	735,8
13	51,8	571,9
14	77,8	1 271,7
15	88,6	360,6
16	99,5	248,8
17	103,4	2 883,8

Peak	Size [kDa]	Rel. Conc. [ng/µl]
18	110,0	46,0
19	111,8	200,3
20	123,9	155,6
21	129,9	5 953,3
22	141,1	1 645,5
23	154,1	1 742,9
24	168,9	708,4
25	171,7	619,6
26	186,5	364,5
27	194,5	37,0
28	237,2	35,2

Рис. 2. Хроматограма розділу компонентів високомолекулярного синьогнійного антигену на біоаналізаторі Agilent-2100

На рис. 3 проілюстрована хроматограма розподілу компонентів високомолекулярного синьогнійного антигену на біоаналізаторі Agilent-2100 після першої стадії вилучення суміші антигенів.

Характерно, що неочищена фракція білків містить 5 піків поглинання, серед яких максимальну концентрацію складає смуга 5 із середньою масою 240 кДа. З літературних джерел відомо, що така розтягнута смуга представляє собою мурамілпептид бактеріальної стінки або його фрагменту [14].



Peak	Size [kDa]	Rel. Conc. [ng/µl]
2	33,0	8,9
3	92,2	0,5
4	135,8	13,5

Рис. 3. Хроматограма розділу компонентів високомолекулярного синьогнійного антигену на біоаналізаторі Agilent-2100 одразу після вилучення суміші білків

Для досліджень та подальшої модифікації смуга № 5 вилучена та модифікована з різнем ступенем ацилювання. Інші білки досліджувалися на предмет стабільності до технологічних стадій очистки.

Результати першої стадії очистки – фракціонування на колонці з гелем сефадекс G-200 з відокремленням високомолекулярних фракцій мурамілпептидів представлено на наступній хроматограмі (рис. 4).

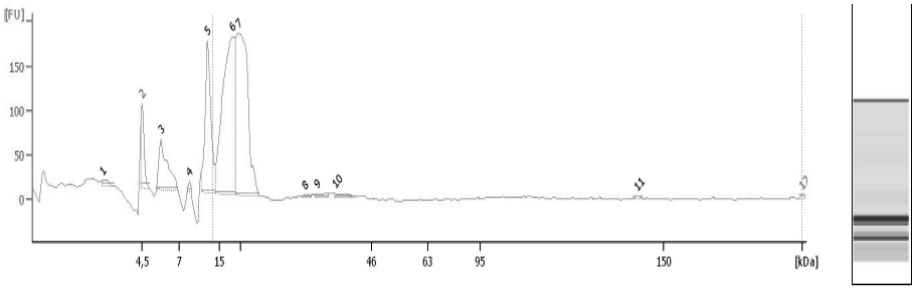
Як видно з наведених даних, після вилучення високомолекулярних фракцій в розчині залишаються білки з молекулярною масою від 3 до 30 кДа, які хоч і дають уяву про загальну імуногенність, по суті являють собою цитоплазматичні клітинні ферменти; наявність антитіл до них не в змозі забезпечити протективний ефект щодо агресивного прояву псевдомонозу. Відповідно, для отримання вакцини вищенаведені фракції нами в подальшому не були використані та в технології вони рахувались за відходи виробництва біологічного характеру.

На рис. 5 представлена пептидна карта мурамілпептиду з фракції 5, з метою стандартизації обробленої трипсином.

Після обробки мурамілпептиду трипсином, утворюється суміш пептидів та глюкопротеїдів в кількості 21. При цьому, у максимальній концентрації залишається полісахарид (глікопротеїд зі смуги №15) з масою 128 кДа та білок зі смуги № 6 з масою 31 кДа. Наведена вище пептидна карта є характерною саме для штама P.aeruginosa 66-16, вона може бути використана для розробки методу якісного аналізу вакцинного препарату в лікарській формі.

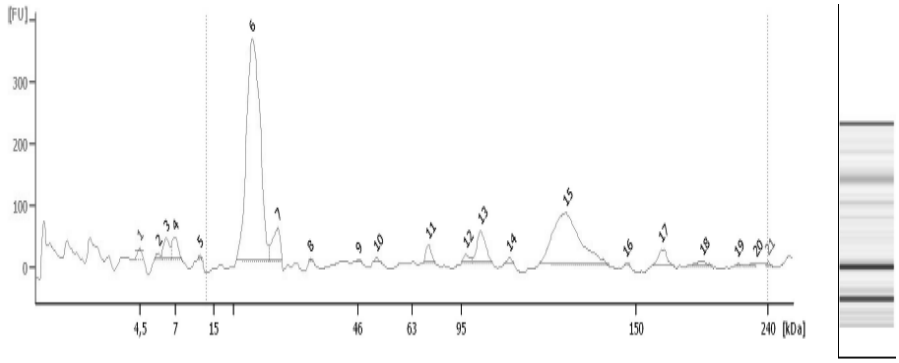
На рис. 6 представлена хроматограма на основі результатів спроби розбити фракцію мурамілпептиду за допомогою ультразвуку (22кГц 5 хвил. в крижаній бані на приладі УЗДН-2Т) на низькомолекулярні фрагменти.

Одним з ефективних технологічних прийомів, які використовуються в отриманні наночасток – ліпосом, а також з метою стерилізації біопрепаратів є застосування ультразвуку. З метою стандартизації мурамілпептиду за молекулярною масою про-



Peak	Size [kDa]	Rel. Conc. [ng/µl]
1	2,9	0,0
3	5,7	0,0
4	8,9	0,0
5	12,6	0,0
6	23,1	22 400,0
7	27,0	23 111,8
8	37,0	197,5
9	38,6	417,4
10	41,0	518,4
11	142,0	66,6

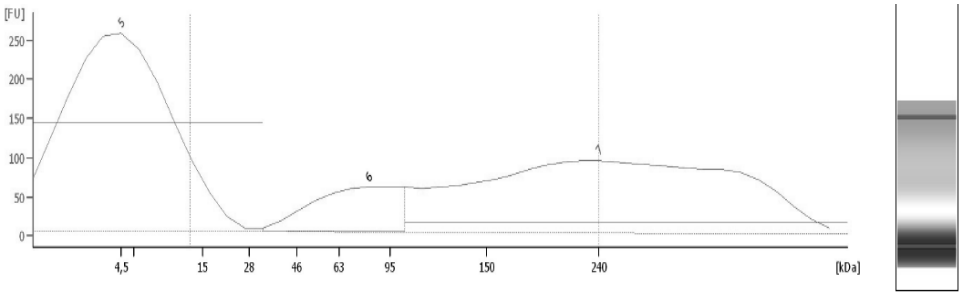
Рис. 4. Хроматограма очищеної суміші білків синьогнійної палички після вилучення високомолекулярної фракції мурамілпептиду



Peak	Size [kDa]	Rel. Conc. [ng/µl]
2	5,8	0,0
3	6,4	0,0
4	7,0	0,0
5	12,2	0,0
6	30,8	19 937,7
7	34,5	1 526,0
8	39,2	33,1
9	46,3	44,0
10	51,8	83,5
11	73,8	435,7
12	96,5	209,5
13	101,2	1 172,8
14	110,3	110,9
15	127,8	4 915,7
16	146,8	17,2
17	166,9	450,4

Peak	Size [kDa]	Rel. Conc. [ng/µl]
18	195,2	171,7
19	219,0	32,7
20	231,5	93,8

Рис. 5. Пептидна карта мурамілпептиду синьогнійної палички з фракції 5, обробленої трипсином

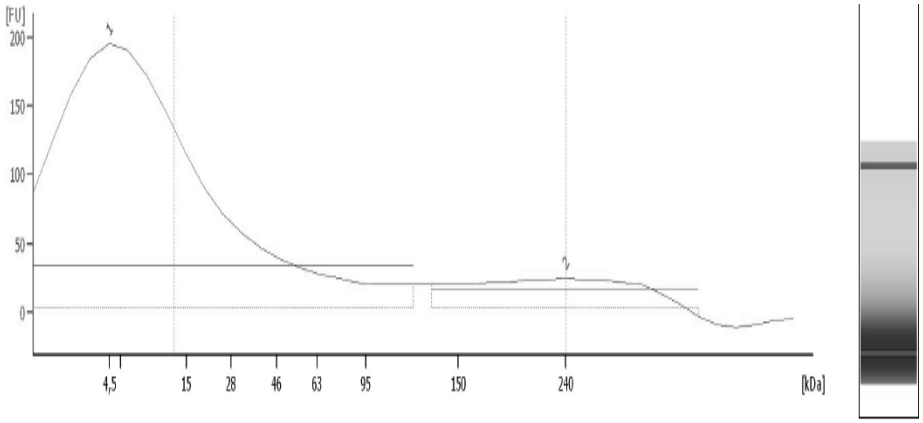


Peak	Size [kDa]	Rel. Conc. [ng/µl]
1	0,0	0,0
2	0,0	0,0
3	0,0	0,0
4	0,0	0,0
6	81,7	12,1
8	523,8	0,0
9	708,3	0,0
10	5 064,4	0,0
11	5 163,7	0,0
12	6 937,4	0,0

Рис. 6. Хроматограма розподілу компонентів мурамілпептиду після обробки його ультразвуком

ведена спроба викликати механоіндукований гідроліз макромолекули мурамілпептиду. Одна широка смуга з масою від 240 кДа до 1,5 мДа розділилася на три великі смуги з масою 4,5 кДа, 72 кДа та 240 кДа. При цьому не спостерігалося чіткого розмежування між смугами, що є характерною ознакою хроматографування полісахаридів та протеогліканів. Доведено, що ультразвук цілком можливо також використовувати для стандартизації мурамілпептиду, хоча трипсиноліз і дає більш чіткі та характерні смуги.

На рис. 7 представлені результати хроматографування суміші мурамілпептидів, оброблених ультразвуком на біоаналізаторі Агілент-2100.



Peak	Size [kDa]	Rel. Conc. [ng/µl]
3	2 842,0	0,0
4	2 953,7	0,0

Рис. 7. Хроматограма розподілу компонентів мурамілпептиду після обробки його ультразвуком та відділення високомолекулярної смуги в області 1,5 мДа

Чітко означено, що смуга 1 відділяється від високомолекулярних речовин та являє собою білковий компонент мурамілпептиду, який можна також використовувати для отримання антигенів. Середня молекулярна маса білкового компоненту складає 4,5 кДа, що відповідає за даними літератури молекулярній масі екзотоксину синьогнійної палички [15].

Таким чином, використовуючи технологію хроматографічного вилучення мурамілпептиду, обробки його ультразвуком та наступним вилученням останньої фракції можна в чистому вигляді вилучати та ідентифікувати екзотоксин псевдомонад з молекулярною масою 4,5 кДа.

Дані щодо кількості вільних карбоксильних груп в ацильованих полісахаридах ілюструє табл. 3.

Таблиця 3 – Характеристики поліаніонних властивостей різних варіантів сукцинильованого антигену

№ п/п	**Варіант антигену, ступінь ацилювання, %**	**Кількість вільних карбоксильних груп**	
		розраховано, n	підтверджено, n
1	1	142,5 ± 5,0	142,0 ± 5,0
2	3	148,0 ± 5,0	155,0 ± 5,0
3	7	162,0 ± 5,0	158,0 ± 5,0
4	10	180,5 ± 5,0	178,0 ± 5,0
5	20	200,2 ± 5,0	196,0 ± 7,0
6	30	240,5 ± 5,0	239,0 ± 7,0
7	50	248,2 ± 5,0	250,0 ± 10,0
8	70	270,0 ± 5,0	268,0 ± 10,0
9	100	295,0 ± 5,0	293,0 ± 10,0
10	нативний антиген	-	12,0 ± 5,0

Вочевидь, що розрахована та підтверджена кислотна валентність сукцинильованих варіантів синьогнійного антигену майже співпадають. Вказане можна було б уже трактувати за критерій для аналізу та стандартизації полісахаридного антигену (фактично мурамової кислоти) синьогнійної палички. Та враховуючи гетерогенність псевдомонад і нестабільність молекулярної маси полісахаридів їх клітинної стінки, ми не наважуємось це зробити. Потрібно додатково вивчати вказаний феномен з використанням паралельно різних біохімічних методів, математичним моделюванням та аналізом за правилами доказової логіки.

Першим зразком обрано модель корпускулярної вакцини на основі інактивованої пастеризацією синьогнійної палички. Ацилювали тільки поверхневі антигени. Ступінь ацилювання коливалася від 1% до 15 % з кроком в 2%. Всього було досліджено 8 зразків модифікованого розчинного антигену та 8 зразків корпускулярного антигену. Результати дослідження імуногенності отриманих зразків ілюструють дані рис. 8.

Так, на 15 добу після ін'єкційного введення нативного вакцинного препарату середній титр антитіл у вакцинованих тварин складав (1 : 640). При цьому пероральне використання нативного корпускулярного антигену не викликало індукції синтезу специфічних антитіл.

Хімічна модифікація антигену на 1 % від концентрації в ньому білку індукував такий же рівень антитіл, як і нативний антиген (1:640). Модифікація поверхневих антигенів на 3 % приводила до індукції антитіл на рівні (1:320) для перорального варіанту та на рівні (1:2560) для ін'єкційного варіанту.

Для похідних антигенів з іншими ступенями ацилювання при їх пероральному використанні не спостерігалося індукції синтезу специфічних антисиньогнійних антитіл. При цьому, ін'єкційний варіант був ефективним навіть до похідного з 15 % ступенем ацилювання: похідне з 5 % ступенем ацилювання індукувало синтез антитіл на рівні (1:1280), похідне із 7 % ступенем ацилювання антигену – на рівні

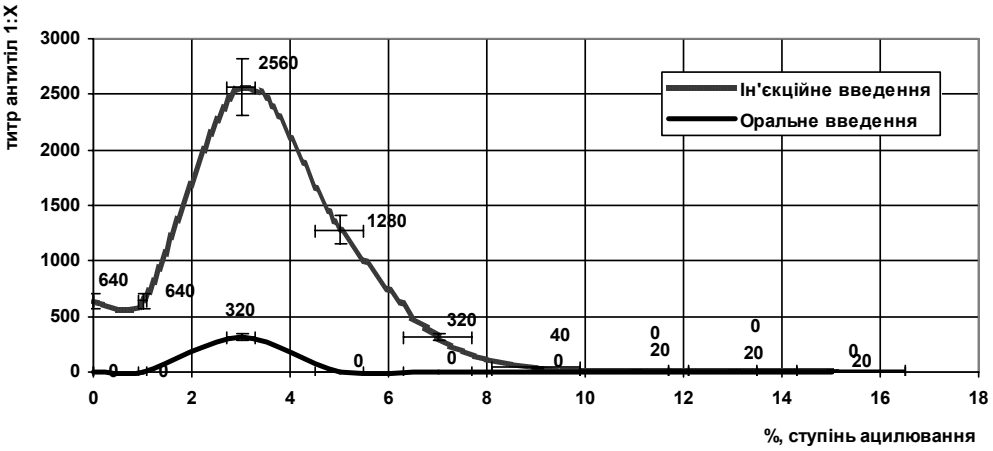


Рис. 8. Залежність між титром індукованих специфічних антитіл та ступенем ацилювання корпускулярного ацильованого синьогнійного антигену

(1: 320), похідне із 9% - на рівні (1:40), інші варіанти (із 11 % та 15 % ступенем модифікації) – на рівні (1:20). Таким чином, найбільш ефективним виявилось похідне із ступенем ацилювання 3 %, яке індукувало синтез специфічних антитіл як при використанні загальновідомої схеми вакцинації при ін'єкційному застосуванні, так і при пероральному застосуванні. Означена залежність між рівнем індукованих специфічних антитіл та ступенем ацилювання розчинного модифікованого антигену (перша фракція) (рис. 9).

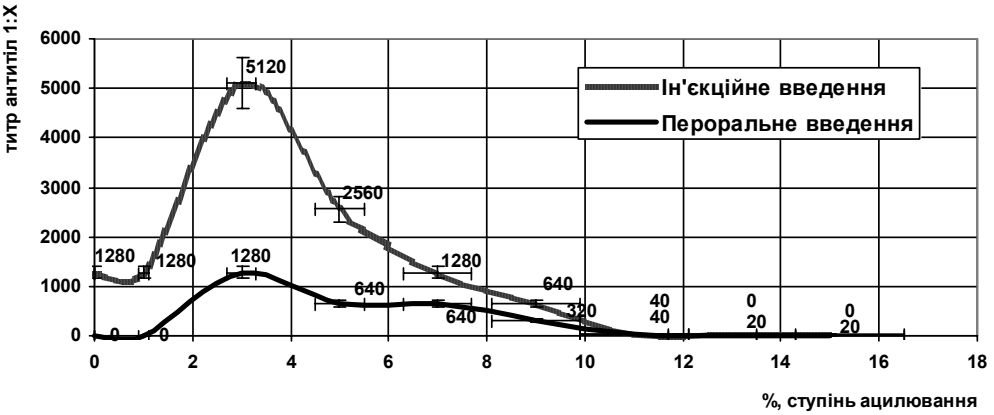


Рис. 9. Залежність між титром індукованих специфічних антитіл та ступенем ацилювання розчинного високомолекулярного ацильованого синьогнійного антигену

Охарактеризований варіант антигену-кандидата являв собою хімічну монокомпонентну вакцину на основі мурамілпептидного модифікованого високомолекулярного антигену з масою 1,5 мДа та зарядом молекули 186000. Саме високомолекулярна перша фракція, яка виходить з колонки при розділенні фракцій, є найбільш імуногенною.

При подальшому дослідженні структури отриманого антигену підтверджено кореляцію між зміною заряду та маси антигену, що свідчить про закінчення хімічної реакції модифікації його структури. Слід також звернути увагу на цікавий факт, виявлений під час ін'єкційної вакцинації мишей: введення немодифікованої вакцини третій раз (на сьомий день) викликало у частини тварин алергічні реакції у

вигляді тремору, падіння рухової активності та відмови вживання їжі протягом доби. При цьому, введення всіх інших модифікованих варіантів вакцини не викликало побічних явищ у тварин. Ацильований варіант розчинного антигену із ступенем ацилювання 1 %, як і неацильований антиген викликали індукцію синтезу однакової кількості антитіл (титр 1:1280). Пероральне використання розчинного антигену та антигену із ступенем ацилювання в 1 % не приводило до індукції синтезу специфічних антисиньогнійних антитіл. Похідне розчинного антигену із ступенем ацилювання 3 % приводило до активації синтезу антитіл на рівні (1:5120) для ін'єкційного варіанту та (1:1280) – для перорального варіанту використання. Ацильоване на 5 % похідне індукувало синтез специфічних антитіл на рівні (1: 640) для пероральної форми застосування та на рівні (1:2560) – для ін'єкційної форми. Похідне із ступенем ацилювання 7 % індукувало синтез специфічних антитіл на рівні (1:640) для пероральної форми та (1:1280) для ін'єкційної. Для розчинного антигену із ступенем ацилювання 11 % відповідний рівень індукованих специфічних антитіл складав (1:320) для оральної форми вакцини та (1:640) – для ін'єкційної. Зрівнялися рівні синтезу антитіл у вакцинованих тварин при пероральному та ін'єкційному застосуванні тільки при використанні вакцинного препарату із рівнем ацилювання 13 % та дорівнювали 1:40, при ступені ж ацилювання в 15 % імуногенною була тільки ін'єкційна форма вакцини – кандидата, але індукувала вона синтез антитіл лише на рівні (1:20). Таким чином, характерною ознакою розчинного викосомолекулярного антигену була індукція синтезу антитіл не тільки у похідного із ступенем ацилювання 3 %, а й у похідних із ступенями ацилювання 5 %, 7 %, 11 %, 13 % при пероральному застосуванні. В чотири рази більшим був титр антитіл при ін'єкційному застосуванні найефективнішого похідного із ступенем ацилювання 3 %, аніж при його ж пероральному використанні. У порівнянні із корпускулярним модифікованим антигеном, ацильоване на 3 % похідне розчинного антигену було вдвічі ефективнішим за імуногенністю при ін'єкційному використанні та в чотири рази більш ефективнішим – при пероральному. Незважаючи на значно більше антигенне навантаження, а ніж при ін'єкційному використанні, пероральне використання частково сукцинильованого розчинного антигену було ефективним та індукувало рівень антитіл, які у перспективі можуть довготривало (рік та більше) захищати тварину від синьогнійної інфекції. Використання пероральної вакцинації є також перспективним напрямком удосконалення вакцин, але залишається ряд невирішених питань: що саме змінюється в імунній системі при індукції синтезу таких високих концентрацій специфічних імуноглобулінів, яка динаміка змін імунної відповіді на пероральний антиген, в чому причина суттєвої затримки з початком імунної відповіді.

Однією з основних задач при проектуванні трансдермальних лікарських засобів є створення носія 5-го покоління (направлених ліпосом) для забезпечення селективного накопичення ліпосом з антигеном у клітинах РЕС. Вказане, на наш погляд, повинно забезпечити імунну відповідь навіть при незначному відсотку проникнення антигену через шкіру. Відповідно, важливою задачею у розробці таких систем є підбір оптимальних складу ліпосомальної мембрани та діаметру ліпосом. З використанням методу багаторазового заморожування–розморожування було отримано зразки пустих ліпосом із флуоресцентним зондом в фосфоліпідній мембрані. Зонд був необхідний для контролю рівня накопичення ліпосом в тканинах РЕС мишей та відбору найбільш перспективного зразку ліпосом. В табл. 4 наведено характеристики отриманих зразків ліпосом. У разі необхідності зменшення діаметру ліпосомальних везикул суспензію додатково обробляли ультразвуком на приладі УЗДН-2Т. Середній діаметр ліпосом встановлювали з використанням градієнтного седиментаційного методу.

Найбільший ступінь накопичення в селезінці мали моноламелярні ліпосоми, що мали у складі своєї мембрани блокований холестерином сукциніл-β-циклодекстрин. Інші зразки ліпосомальних суспензій накопичувалися в тканинах з різною гідрофобною тропністю. Чим більшим був діаметр ліпосом, тим більший їх відсоток осідав в клітинах печінки: при діаметрі ліпосом 200 нм та більше, майже 50 % всіх введених ліпосом осідало в печінці. Таким чином, найбільш придатними для використання

Таблиця 4 – Характеристика імунотропних ліпосом-кандидатів для створення трансдермальних вакцинних систем

№ зразку	Склад фосфоліпідної мембрани	Вид ліпосом	Діаметр ліпосом, нм	Ступінь накопичення ліпосом у тканинах мишей за індексом флюоресценції проти контролю, %					
				печінка	селезінка	нирки	легені	мозок	серце
1	Фосфотидилхолін, фосфотидилетаноламін	полівезикулярні	200±30	42±2	15±8	2±1	8±4	5±2	1
2	-//-	-//-	200±30	48±2	15±8	2±1	7±4	5±2	2±2
3	-//-	-//-	200±30	42±2	14±8	0	6±4	6±2	2±2
4	-//-	-//-	200±30	46±2	19±8	0	8±4	4±2	2±2
5	-//-	-//-	100±30	30±2	15±8	0	8±4	5±2	1±1
6	-//-	-//-	100±30	29±2	19±8	1±1	9±4	7±2	1±1
7	Фосфотидилхолін, фосфотидилетаноламін, сукциніл-в-циклодекстрин	моноламелярні	50±20	29±2	27±10	0	9±4	3±2	3±2
8	-//-	-//-	50±20	30±2	25±10	0	8±4	3±2	2±2
9	-//-	-//-	50±20	30±2	28±10	0	7±4	3±2	2±2
10	-//-	-//-	50±20	30±2	24±10	1±1	7±4	2±2	2±2
11	-//-	-//-	150±20	30±2	15±8	1±1	7±4	1±1	2±2
12	-//-	-//-	150±20	30±2	14±8	1±1	7±4	1±1	3±2
13	-//-	-//-	150±20	30±2	18±8	1±1	7±4	1±1	3±2
14	-//-	-//-	150±20	30±2	17±8	0	7±4	1±1	3±2
15	Фосфотидилхолін, фосфотидилетаноламін, хлорофілл-б	моноламелярні	150±20	30±2	14±8	0	7±4	1±1	2±2
16	-//-	-//-	150±20	30±2	15±8	0	7±4	1±1	1±2
17	-//-	-//-	150±20	30±2	15±8	0	7±4	2±2	1±2
18	-//-	-//-	150±20	30±2	16±8	0	7±4	2±2	1±2
19	-//-	-//-	150±20	28±2	14±8	0	7±4	2±2	1±2
20	-//-	-//-	150±20	28±2	14±8	0	8±4	2±2	1±2
21	-//-	-//-	150±20	28±2	16±8	2±1	7±4	2±2	1±2
22	-//-	-//-	150±20	28±2	14±8	2±1	7±4	2±2	1±2
23	-//-	-//-	150±20	28±2	14±8	1±1	7±4	2±2	1±2

в якості носіїв вакцинних антигенів означено ліпосоми з діаметром у середньому 50 нм та щоб мембрана їх включала фосфотидилхолін, фосфотидилетаноламін і сукциніл-β-циклодекстрин. Отримані ліпосоми моноламелярні, що продиктувало необхідність додаткової їх обробки ультразвуком.

Висновки. 1. Серед отриманих варіантів ацильованих антигенів означено сукцинильований на 3 % від маси білку розчинний мурамілпептидний антиген, який при пероральному застосуванні на 15 добу викликав індукцію синтезу специфічних антитіл у титрі (1:1280) при пероральному застосуванні та титр (1:5120) – при ін'єкційному.

2. Серед отриманих зразків ліпосом для подальшого конструювання трансдермальних вакцин відібрано моноламелярні ліпосоми, діаметр яких складав в середньому 50 нм, мембрана їх вміщувала фосфотидилхолін, фосфотидилетаноламін та сукциніл-β-циклодекстрин.

Список літератури

1. Суровикин, Д.М., Краснопевцева, О.С. Синегнойная инфекция в хирургии // Вестник хирургии им. А.С Грекова. – 1998. – №7. – С. 124-130. ***2.*** Черномордик, А.Б. Некоторые культуральные и биохимические свойства B. pyocianeus. – ЖМЭИ. – 1996. – №2-3. – С. 12-22. ***3.*** Дзюбак, С.Т.// Некоторые эпидемиологические аспекты современной синегнойной инфекции, ЖМЭИ. – 1993. – №4. – С. 29-33 ***4.*** Мороз, А.Ф., Радкевич, С.А., Анциферова, Н.Г. Получение и экспериментальное изучение поливалентной корпускулярной вакцины для профилактики инфекций, обусловленных P. aeruginosa // Микробиологический журнал. – 2005. – №3. – С. 47-52. ***5.*** Омельянец, Т.Г., Проценко, А.А. Влияние P. aeruginosa на некоторые процессы микробного самоочищения почвы // Микробиологический журнал. – 1986. – №5. – С. 22-28. ***6.*** Nicas, T.I. Outer membrane protein HE of P. aeruginosa. H.J. Bacteriol. – 2006. – №3. – P. 151-155. ***7.*** Губський, Ю.І. Біологічна хімія. – Вища школа. – 2005.– 480 с. ***8.*** Арганов, А.Н. Микросомальное окисление. – М.: Наука. – 1985 – 327 с. ***9.*** Берёзов, Т.Т., Коровкин, Б.Ф. Биологическая химия. – М.: Медицина. – 2001. – 752 с. ***10.*** Кресюн, В.И. Клинические проблемы иммунофармакологии – Одесса. – 1993. – 432 с. ***11.*** Hackerston, I.D. // Biochemistry. – 2000. – 522 p. ***12.*** Мартынов, А.В. Ацилирования антигенов Ps. aeruginosa. – Фармация. – 2000. – №3. – С. 14-18. ***13.*** Лисняк, Ю.В. , Волянский, А.Ю., Дубинина, Н.В. и др.// Компьютерное моделирование в поиске лекарственных средств. – Харьков, ОКО. – 2006. – 189 с. ***14.*** Stryer, L.A. Biochevistry // W.H. Greeman and Company. – New York. – 2003. – 1002 p. ***15.*** Далин, М.В., Фиш, Н.Р. Белковые токсины микробов. – М: Медицина. – 1996. – 284 с.

TECHNOLOGICAL ASPECTS OF CONSTRUCTING OF VACCINES FOR MEDICINE AND VETERINARY ON THE BASIS OF THE ACYLATED DERIVATIVE IMMUNOGENIC BIOPOLYMERS P.AERUGINOSA

Martynov A.V., Volyanskaya N.P.

SE « Mechnikov Institute of Microbiology and Immunology of the AMS of Ukraine»

Succinylated derivatives of antigenic albumens of blue pus bacillus with different degree of modification have been received. Their most immunogenic variants have been determined with the purpose of subsequent development of medicinal forms of immunobiological preparations for transdermal and peroral application in human and veterinary medicine.

УДК 612.33: 636.2

КІЛЬКІСНА ХАРАКТЕРИСТИКА СТРУКТУРНИХ КОМПОНЕНТІВ СЛИЗОВОЇ ОБОЛОНКИ ПОРОЖНЬОЇ КИШКИ ВЕЛИКОЇ РОГАТОЇ ХУДОБИ У ПРЕНАТАЛЬНОМУ ОНТОГЕНЕЗІ

Масюк Д.М.

Дніпропетровський державний аграрний університет, e-mail: plppm@ua.fm

Метою досліджень було встановлення закономірності кількісної характеристики структурних компонентів слизової оболонки порожньої кишки плодів великої рогатої худоби у пренатальному онтогенезі. Об'єктом досліджень були плоди, віком від 2 до 9 місяців. Особливості морфогенезу слизової оболонки порожньої кишки визначали при дослідженні гістопрепаратів. У результаті досліджень встановлено, що процеси гістогенезу слизової оболонки відбуваються неодночасно, супроводжуються змінами рельє-