

После 4-й вакцинации было отмечено существенное увеличение уровня специфических иммуноглобулинов в слёзной жидкости и трахеальных смывах цыплят. При этом пик выработки иммуноглобулинов класса М был отмечен через 1–2 недели, а класса G – через 2–3 недели после 4-й вакцинации. Максимальный уровень IgA в слёзной жидкости был выявлен через 1 неделю, а в трахеальных смывах – через 4 недели после 4-й вакцинации. Наличие существенной разницы между 1 и 2 группами было отмечено в количестве IgG, выявленном в трахеальных смывах через 3 недели и в слёзной жидкости – через 8 недель после последней вакцинации (в 1 группе в 2 и 3 раза больше, чем во второй).

Полученные нами результаты подтверждают данные других авторов [3, 4], что местное введение инактивированного вируса и мукозальных адьювантов стимулировало выработку антител в верхнем респираторном тракте и слёзной жидкости цыплят и системную индукцию антител в крови.

Для оценки эффективности стимуляции клеточного иммунитета у цыплят в различные сроки после первой вакцинации проведены исследования фенотипических изменений в иммунограмме птиц. Полученные результаты показали, что наибольшая активация иммунокомпетентных клеток у цыплят, привитых вакциной с эмульсигеном®-D, была отмечена после 3-й вакцинации. При этом объём позитивных CD4, CD8α и CD3 T-клеток в крови этих цыплят был в 2; 1,3–1,5 и 1,4–1,3 раза больше, чем у птиц, вакцинированных одним антигеном вируса НБ и контрольных, соответственно. Это подтверждает данные других исследователей по усилению активации клеточного звена иммунитета при местном применении инактивированных вирусов совместно с адьювантами [5].

Таким образом, введение дополнительной 4-й прививки при использовании мукозальной инактивированной вакцины против НБ вызывало существенное усиление мукозального и системного иммунного ответа.

**Выводы.** Было установлено, что 4-кратная иммунизация экспериментальной вакциной против НБ с адьювантом эмульсиген®-D являлась оптимальной для создания необходимой продолжительности иммунитета перед применением традиционной инактивированной вакцины, так как в этом случае помимо формирования местного иммунитета происходит значительная активизация гуморального иммунного ответа.

Работа выполнена в рамках проекта МНТЦ 3460р.

#### Список литературы

1. Применение иммуноферментной тест-системы для выявления специфических IgA, IgM и IgG к вирусу ньюкаслской болезни птиц в секреторных жидкостях и сыворотках крови кур [Текст] / М.А. Волкова [и др.] // Тр. Федерального центра охраны здоровья животных. – Владимир, 2007. – Т. 6. – С. 176–185.
2. Протективные свойства экспериментальной мукозальной вакцины против ньюкаслской болезни [Текст] / М.А. Волкова, И.А. Чвала, А.В. Ирза // Ветеринария и кормление. – 2012. – № 5. – С. 10–12.
3. A lack of antibody formation against inactivated influenza virus after aerosol vaccination in presence or absence of adjuvantia [Text] / E.D. Geus [et al.] // Vet. Immunol. Immunopathol. – 2011. – Vol. 143. – P. 143–147.
4. Effect of lipopolysaccharide on intranasal administration of liposomal Newcastle disease virus vaccine to SPF chickens [Text] / L.P. Tseng [et al.] // Vet. Immunol. Immunopathol. – 2009. – Vol. 3. – P. 285–289.
5. Humoral, cell-mediated and mucosal immunity induced by oculo-nasal vaccination of one-day-old SPF and conventional layer chicks with two different live Newcastle disease vaccines [Text] / F. Rauf [et al.] // Vaccine. – 2009. – Vol. 27. – P. 3631–3642.
6. Rabies DNA vaccine encoding lysosome targeted glycoprotein supplemented with EMULSIGEN D confers complete protection in pre-and post-exposure studies in BALB mice [Text] / M. Kaur [et al.] // FASEB J. – 2010. – Vol. 24. – P. 173–183.

### APPLICATION OF MUCOSAL VACCINE WITH ADJUVANT EMULSIGEN®-D AGAINST NEWCASTLE DISEASE

Volkova M.A., Chvala I.A., Irza A.V., Dolgov D.L.

FGBI «Federal Centre for Animal Health», Vladimir, Russia

Kapczynski D.P.

ARS SERPL, USA

*The present study describes the immunogenic properties of mucosal vaccine against Newcastle disease with Emulsigen®-D by fourfold intranasal-intraocular administration. The additional fourth inoculation in 21 days after the third vaccination induced the significant increasing of antibody titer in sera, lacrimal fluids and tracheal lavages of chicken that have been tested in HI test and ELISA in comparison with threefold vaccination. The activation of immune competent cells of chicken inoculated with experimental vaccine has significantly higher expression after the third vaccination.*

УДК 577.11:542.951.1:615.281

### ПЕРСПЕКТИВА РОЗРОБКИ ВАКЦИННИХ ПРЕПАРАТІВ НА ОСНОВІ АЦИЛЬОВАНИХ ПОХІДНИХ ІМУНОГЕННИХ БІОПОЛІМЕРІВ *P. AERUGINOSA*

Волянська Н.П.

ДУ «Інститут мікробіології та імунології ім. І.І. Мечникова» НАМНУ, м. Харків

Класичні інфекційні хвороби та гнійно-запальні захворювання мікробного генезу і сьогодні відіграють вельми важливу роль в формуванні основних показників здоров'я населення України, викликають занепокоєність не лише за причин значної поширеності та економічних збитків, але і через реальну загрозу існуванню нації. У країні реєструється понад 150 нозологічних форм інфекційних хвороб, в останнє десятиріччя захворюваність на них складає третину від захворюваності загальної [1–3].

Одну з нагальних проблем сучасної гуманної та ветеринарної медицини складають псевдомонози, захворювання, які являють загрозу для вельми широких верств населення і тварин. За останні десятиріччя навіть в економічно розвинених країнах нозокоміальні та внутрішньолікарняні інфекції не мають чіткої тенденції до зниження (по критеріям поширеності та захворюваності), призводять до великих економічних збитків, суттєвого погіршення якості життя, соціальних негараздів (вельми часта хронізація гнійно-запального процесу та як наслідок - інвалідність потерпілого). Не винятком є і синьогнійна інфекція з важким перебігом хвороби, що ускладнюється сепсисом, враженням самих різних органів і систем. У медицині псевдомонози особливо агресивно проявляють себе в хірургічних стаціонарах, опікових клініках, соматичних лікарнях самого різного профілю; у ветеринарії – у тварин самих різних видів, домашньої птиці, часто страждає племінний контингент, що має відлуння в ряду поколінь. Проблема синьогнійної інфекції з сугубо медичної та ветеринарної неухильно трансформується в соціальну, економічну та політичну [4–7].

**Матеріали та методи досліджень.** У роботі використано штами *P. aeruginosa* 66–16 Національного музею культур мікроорганізмів ДУ «Інститут епідеміології та інфекційних хвороб ім. Л.В. Громашевського АМН України», а також штами *P. aeruginosa* АТСС № 9027 та *P. aeruginosa* № 27853, раніше відітовані та охарактеризовані клінічні ізоляти *P. aeruginosa* (усього 19 культур).

Водорозчинний високомолекулярний сукцинільований антиген отримували шляхом механічної деструкції, центрифугування, гель-фільтрації та хімічної модифікації (сукцинілювання). Стандартизацію антигенів проводили за концентрацією білку, молекулярною масою та зарядом молекули. В якості контролю використовували очищені білки F<sub>rv</sub>A та OprF, які отримували за методом Gilleland H. і співавт., 1988 р.

Для означення заряду молекули білку використовували метод іонообмінної хроматографії на смолі аніоніт А 500 (фірми, «Pirrolite», США).

Концентрацію білку встановлювали за біуретовою реакцією, методикою Флореса та спектрофотометричним методом. Оптичну щільність вимірювали при довжині двох хвиль: 260 нм та 280 нм. Склад білка – X (мг/мл) визначали за формулою Калькара:  $X = 1,45 \times D_{260} - 0,74 \times D_{280}$ .

Для ідентифікації фракцій альгінопротеїдів, пептидного картування трипсиногідролізатів стандартних білків F<sub>rv</sub>A та OprF (Gilleland H. і співавт., 1988) використовувати біоаналізатор Agilent 2100

Експерименти на тваринах виконано згідно Міжнародним рекомендаціям щодо проведення медико-біологічних досліджень з використанням тварин (Хроніка ВООЗ, 1985) та Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються з експериментальною та іншою науковою метою (Страсбург, 1980).

Для об'єктивного судження про ступінь вірогідності отриманих результатів дослідження використано варіаційно-статистичний метод аналізу за допомогою прикладних комп'ютерних програм з електронними таблицями Microsoft Excel та Biostat.

**Результати досліджень.** Наведено основні властивості та фізико-хімічні параметри ацильованих білків синьогнійної палички. В якості моделі для означення залежності рівня імуногенності від ступеню ацилювання використано псевдомонадний мураміл-пептидний антиген з молекулярною масою 1,1–1,5 мДа. Результати фізико-хімічної характеристики сукциніл-антигену надано в таблиці 1.

**Таблиця 1 – Фізико-хімічні властивості отриманих похідних синьогнійного антигену**

| № п/п | Варіант антигену, % ацилювання | Rf   | Розрахована Mr, kDa | Встановлена Mr, kDa | Утворення голковидних 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                       | 0,36 | 1180,0±5,5          | 1150,5±5,5          | -                               |

**Примітка:** \* – розбіжності показників до нативного варіанту відрізняються статистично значимо (P<0,05); «-» – викристалізування у вигляді плівки.

Дані табл. 1 свідчать про те, що коливання між розрахованими та експериментально визначеними параметрами молекулярної маси різних за ступенем ацилювання варіантів антигену знаходяться в межах довірчого інтервалу. При висушуванні лише антигени з високим ступенем ацилювання (>70 %) набувають стану кристалів голковидної форми. Інші варіанти антигенів теж здатні викристалізуватись, але у вигляді плівки.

Слід зауважити, що максимальна (100 %) ступінь ацилювання призводила до втрати полісахаридом здатності реагувати на фенол-сірчаний реактив, при цьому на хроматограмі вказаний комплекс достатньо чітко виявлявся при фарбуванні розчином карміну (рис.1).

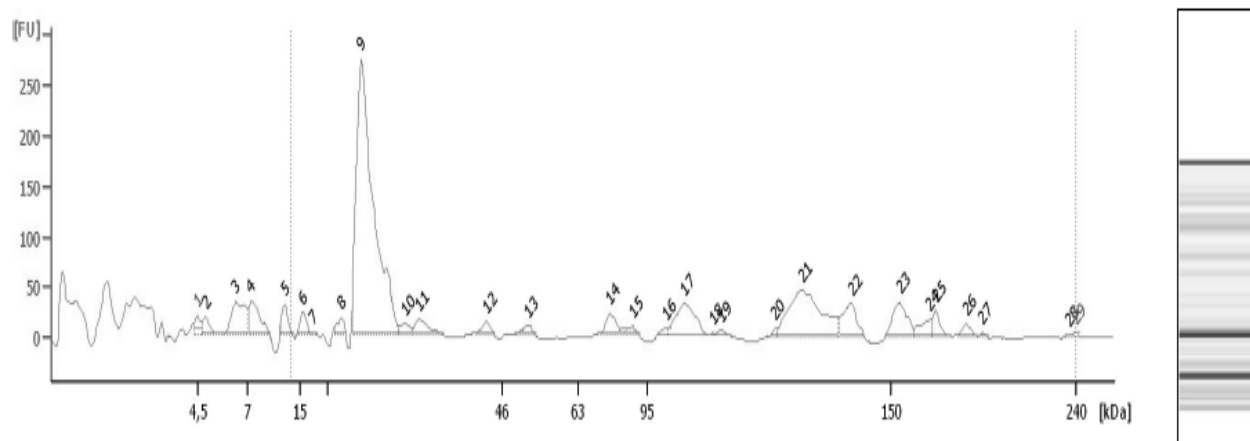
Дані рис. 1, отримані з використанням високочутливого біоаналізатору Agilent–2100, торкаються лише глікопротеїдів клітинної стінки псевдомонад (результати з фракціонування мурамілпептиду з молекулярною масою 1,5 мДа нами умисно вилучено). Основну фракцію достатньо повно очищеного антигену (смуга 9) складає високомолекулярний глікопротеїд (м.м. 31,5 кДа). Інші білки проявляються в значно нижчих концентраціях. Серед вірогідно значимих слід увагу звернути на білки з молекулярною масою 103,4 кДа (смуга 17) та (129,9 кДа (смуга 21). І хоча кількість їх знаходиться в межах (2000–6000 нг/мкл), що значно нижче концентрації основної діючої речовини (35746 нг/мкл), нами вони теж означені як потенційно імуногенні і в подальшому використані в дослідках.

З метою означення залежності величини заряду молекул окремих варіантів антигену від ступеню ацилювання використано метод іонообмінної хроматографії. За критерієм наявності вільних карбоксильних радикалів в ацильованому полісахариді охарактеризовано поліаніонні властивості різних компонентів антигену (табл. 2).

**Таблиця 2 – Характеристика поліаніонних властивостей різних варіантів сукцинільованого антигену**

| № п/п | Варіант антигену, ступінь ацилювання, % | Кількість вільних карбоксильних груп, розрахована, n | Кількість вільних карбоксильних груп, встановлена, 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                                | 124,0 ± 5,0  | 120,0 ±5,0   |

**Примітка:** \* – розбіжності показників до нативного варіанту відрізняються статистично значимо (P<0,05)



| Peak | Size [kDa] | Rel. Conc. [ng/μl] | Peak | Size [kDa] | Rel. Conc. [ng/μl] |
|------|------------|--------------------|------|------------|--------------------|
| 2    | 4,9        | 0,0                | 18   | 110,0      | 46,0               |
| 3    | 6,4        | 0,0                | 19   | 111,8      | 200,3              |
| 4    | 7,5        | 0,0                | 20   | 123,9      | 155,6              |
| 5    | 12,6       | 0,0                | 21   | 129,9      | 5 953,3            |
| 6    | 16,3       | 1 333,1            | 22   | 141,1      | 1 645,5            |
| 7    | 20,7       | 72,0               | 23   | 154,1      | 1 742,9            |
| 8    | 29,4       | 920,7              | 24   | 168,9      | 708,4              |
| 9    | 31,5       | 35 746,3           | 25   | 171,7      | 619,6              |
| 10   | 35,9       | 763,9              | 26   | 186,5      | 364,5              |
| 11   | 37,4       | 1 545,9            | 27   | 194,5      | 37,0               |
| 12   | 44,5       | 735,8              | 28   | 237,2      | 35,2               |
| 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            |      |            |                    |

Рис. 1. Хроматограма розподілу компонентів високомолекулярного антигену *P. aeruginosa*.

Дані табл. 2 свідчать, що кислотна валентність сукцинільованих варіантів псевдомонадного антигену, розрахована попередньо та отримана в реальному експерименті, фактично повністю співпадає. Безсумнівно, нами враховано кислотність полісахариду (за показником мурамової кислоти) та проведено порівняння з контролем, однак для ствердження, що для поглибленої характеристики полісахаридного антигену вказаний аналітичний критерій високоінформативний та коректний, на теперішній час існуючих наукових доказів не достатньо. Вказане обумовлено також і нестабільністю молекулярної маси нативного антигену та його вираженою гетерогенністю, на що вказують А.Ф. Мороз (1998), Е.С. Станіславський (2003), А.С. Кросс (2000), Н.Н. Ноттendorf (2006).

В якості першого зразку для поглибленого та всебічного дослідження означено корпускулярну вакцину, отриману при пастеризаційному інактивуванні клітин вакцинного штаму *P. aeruginosa*.

Ацилюванню підлягали лише поверхневі антигени (без мукоїдного слизу). Ступінь ацилювання коливалась в межах від 1 % до 15 % з кроком 2 %. Отримано та досліджено зразки модифікованого розчинного антигену в порівнянні з аналогічною кількістю зразків нативного корпускулярного антигену. Дані щодо їх імуногенності ілюструє рис. 2.

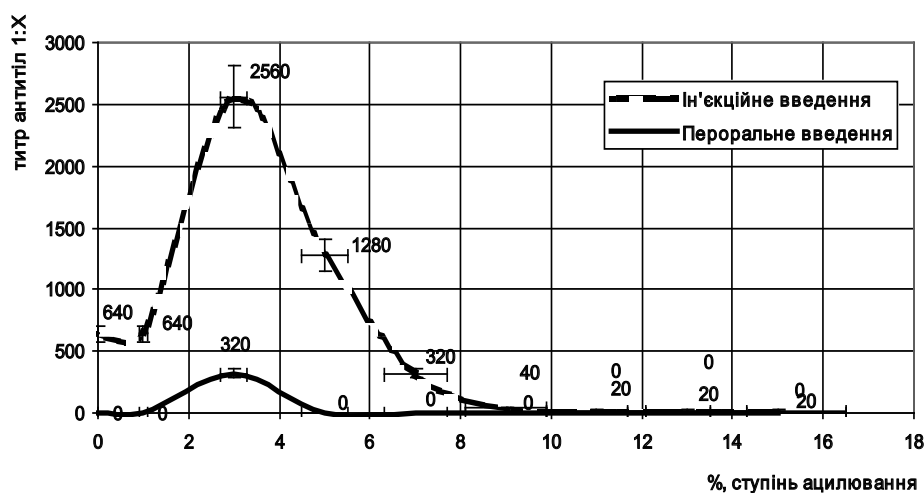


Рис. 2. Залежність між титром індукованих специфічних антитіл і ступенем ацилювання корпускулярного ацильованого синьогнійного антигену

Як видно з рис. 2, 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.

Хімічно модифікований антиген 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.

Для похідних антигенів з іншими ступенями ацилювання при їх пероральному використанні не спостерігалось індукції синтезу специфічних антисиньогнійних антитіл. При цьому, ін'єкційний варіант був ефективним навіть з похідним з 15 % ступенем ацилювання: похідне з 5 % ступенем ацилювання індукувало синтез антитіл на рівні (1:1280), похідне із 7 % ступенем ацилювання – на рівні (1:320), похідне із 9 % – на рівні (1:40), інші варіанти (із 11 % та 15 % ступенем модифікації) – на рівні (1:20).

**Висновки.** Доведено, що часткове ацилювання суттєво підвищує гідрофільність молекули білку та її заряд, що, на наш погляд, надає змогу імуніцитам більш чітко та широко розпізнавати епітопні фрагменти в структурі ацилполісахариду, аніж у нативному антигені.

Найбільш ефективним виявилось похідне із ступенем ацилювання 3 %, яке індукувало синтез специфічних антитіл як при ін'єкційному, так і при пероральному застосуванні.

#### Список літератури

1. Мартинов, А.В. Новый напрямок у розробці ліків – хімічна модифікація генно-інженерних білкових ліків та вакцинних антигенів [Текст] / А.В. Мартинов, Н.П. Волянська // Укр. журн. клініч. та лаб. медицини. – 2008. – Т. 3, № 4. – С. 100–103.
2. Diaz-Romero, J. Coexpression of CD4 and CD8alpha on rat T-cells in whole blood: a sensitive marker for monitoring T-cell immunosuppressive drugs [Text] / J. Diaz-Romero, G. Vogt, G. Weckbecker // J. Immunol. Methods. – 2001. – Vol. 1, № 254 (1-2). – P. 1–12.
3. Ballmer, K. Modulation of EGF binding and action by succinylated concanavalin A in fibroblast cell cultures [Text] / K. Ballmer, M.M. Burger // J. Supramol. Struct. – 1980. – Vol. 14, № 2. – P. 209–214.
4. Hancock, R.E.W. Outer membrane of *Pseudomonas aeruginosa*: heat- and 2-mercaptoethanol-modifiable proteins [Text] / R.E.W. Hancock, A.M. Carey // J. Bacteriol. – 1979. – Vol. 44, № 140. – P. 902–910.
5. Белковые компоненты питательных сред и их антигенные свойства [Текст] / А.А. Шинкаренко [и др.] // Журн. микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. – 1976. – № 4. – С. 100–103.
6. Некоторые физико-химические характеристики анатоксина синегнойной палочки [Текст] / А.А. Шинкаренко [и др.] // Микроб. журн. – 1986. – Т. 48, № 6. – С. 29–31.
7. *Pseudomonas aeruginosa* lipid A diversity and its recognition by Toll-like receptor 4 [Text] / R.K. Ernst [at al.] // J. Endotoxin Res. – 2003. – Vol. 9, № 6. – P. 395–400.

### PERSPECTIVE OF THE VACCINE PREPARATIONS DEVELOPMENTS BASED ON ATSYLOVANYH IMMUNOGENIC DERIVATIVES BIOPOLYMERS P.AERUGINOSA

Volanska N.P.

SE «Institute of microbiology and immunology the name of I.I. Mechnikov National Academy of Medical Sciences of Ukraine», Kharkiv

*On the basis of surface antigens P. aeruginosa 66-16 by acylation returned substance has high glycoproteides. In this experiment the immunogenicity of antigens 48 samples of different degree of acylation were investigated, 12 of them were selected for constructing anti-pseudomonas vaccines. As carriers of antigens used liposomes of 50 nm m.m.900 Da. The degree of accumulation lecithin's liposomes in the cells of reticulo-endothelial system of animals. The vaccine was stabilized by ascorbate Na, protected by conservant – benzoate Na. A two dosage forms of vaccine – for transdermal and oral delivery were created. The stability and sensitizing properties of the vaccine preparation were studied. Normative and technical documentation, specifications and project pharmacopoeial article for two dosage forms vaccine (transdermal and oral) were developed.*

УДК 579.880+57.082.544

### ПЕРСПЕКТИВА РОЗРОБКИ І КОНСТРУЮВАННЯ ВАКЦИННИХ ПРЕПАРАТІВ НОВИХ ПОКОЛІНЬ ДЛЯ ГУМАННОЇ ТА ВЕТЕРИНАРНОЇ МЕДИЦИНИ

Волянський А.Ю.

ДУ «Інститут мікробіології та імунології ім. І.І. Мечникова НАМН України», м. Харків

Розробка вакцин майбутнього проводиться в кількох напрямках: створення генноінженерних вакцин, синтетичних пептидних препаратів, ДНК-вакцин, антиідіотипових вакцин, рослинних та мукозальних (ентеральних) препаратів тощо.

Науковці ДУ «Інститут мікробіології та імунології ім. І.І. Мечникова НАМН України» (м. Харків) розробляють вакцин найближчого майбутнього – ентеральних форм імунобіологічних препаратів.

Часом і фактами підтверджено, що масові щеплення призводять до значного зниження захворюваності на дифтерію та кашлюк. Проте навіть ретельна, з використанням надійних препаратів, планова вакцинація не завжди забезпечує достатньо тривалий специфічний імунітет. За літературними даними в США, Франції, Данії та багатьох інших країнах спостерігається швидке та суттєве зниження кількості антитіл у крові вже через рік після первинної імунізації у 10 % щеплених дітей, через 3 роки – майже у 70 % щепленого контингенту. На наш погляд, вказане пов'язано, також і з зменшенням частоти природного контакту людей зі збудниками дифтерії та кашлюку, обумовленої циркуляцією патогенних бактерій в популяції, що негативно позначається на інтенсивності ревакцинації [1].

Відтворення процесів природного антигенного стимулу частково можна досягти за допомогою організації періодичних масових додаткових щеплень малими дозами вакцини. Проведення такої «бустер-імунізації» дитячого населення можливе лише за наявності профілактичних препаратів з оптимізованим (полегшеним, спрощеним) шляхом їх введення. Мова йде про пероральні форми вакцин.

Однією з недостатньо вирішених проблем при зазначених інфекціях являється також імунологічна толерантність. Вирішення її в значній мірі може бути пов'язане із застосуванням препаратів з різкими антигенними властивостями, **підвищуючих** чутливість дітей та дорослих до імунобіологічних засобів.

Розробка пероральних вакцин дозволить забезпечити безперервність антигенного стимулу, що прямує опосередковано (але постійно) буде підтримувати на достатньо високому рівні колективний імунітет щодо інфекцій, керованих засобами специфічної