

0-772313

На правах рукописи



УСТЮГОВ Яков Юрьевич

**ИММУНОБИОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА БЕСКЛЕТОЧНОЙ
КОКЛЮШНОЙ ВАКЦИНЫ**

03.00.07 Микробиология

14.00.36 Аллергология и иммунология

**Автореферат диссертации на соискание ученой степени кандидата
биологических наук**

Пермь - 2008

Работа выполнена в лаборатории экологической иммунологии Института экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН, Пермь и в лаборатории комбинированных вакцин филиала ФГУП «НПО «Микроген» МЗ и СР РФ «Пермское НПО «Биомед»

Научные руководители:

доктор биологических наук **Николаева Алла Максимовна**
кандидат медицинских наук, доцент **Шиллов Юрий Иванович**

Официальные оппоненты:

доктор медицинских наук, профессор **Маслов Юрий Николаевич**

доктор биологических наук, профессор **Ребров Анатолий Яковлевич**

Ведущая организация: ГОУ ВПО «Санкт-петербургская педиатрическая медицинская академия».

Защита состоится "4" сентября 2008 г., в 10 часов на заседании диссертационного совета ДМ004.019.01 в Институте экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН по адресу: 614081, г. Пермь, ул. Голева, 13.
Факс (342) 244 67 11.

Автореферат диссертации размещен на сайте Института экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН (<http://www.iegm.ru>).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН.

Автореферат разослан " ____ " _____ 2008 г.

Ученый секретарь диссертационного совета
кандидат биологических наук

Максимова Юлия Геннадьевна

НАУЧНАЯ БИБЛИОТЕКА КГУ



0000429037

Актуальность проблемы. Заболеваемость коклюшем остается серьезной проблемой не только российского, но и зарубежного здравоохранения. Ежегодно в мире заболевает коклюшем около 60 млн. человек, а умирает от него около 1 млн. (Селезнева и др., 2002).

Многолетняя практика применения АКДС-вакцины, содержащей цельноклеточный коклюшный компонент, доказала его профилактическую эффективность. При достаточно высоком охвате вакцинацией, АКДС обеспечивает защиту более 85% привитых (Чупринина и др., 2005). Однако цельноклеточная коклюшная вакцина при всех ее положительных свойствах является одним из наиболее реактогенных препаратов, включенных в национальные календари прививок разных стран (Mattoo, Cherry, 2005). Накоплены данные о разнообразных проявлениях реактогенности АКДС-вакцины, обусловленных цельноклеточным коклюшным компонентом (Медуницын, 2004, Сухинин, 2005). Потребность в менее реактогенном препарате послужила основанием для разработки вакцин нового поколения на основе протективных антигенов *Bordetella pertussis*. Первая бесклеточная коклюшная вакцина была зарегистрирована в Японии в 1981 г. В последующем в Европе и США было создано более 20 подобных препаратов, отличающихся по составу антигенов, методам очистки, методу инактивации токсина, адьювантам (Капио и др., 2005). Некоторые из них в виде монопрепарата или компонента комбинированных вакцин стали коммерческими, зарегистрированы и применяются на практике во многих странах, включая Россию. Отечественные бесклеточные коклюшные компоненты вакцины АКДС (Захарова и др., 1998; Москаленко и др., 2001) пока не вышли из стадии научно-исследовательской разработки.

Известные бесклеточные коклюшные вакцины содержат в своем составе от 1 до 5 и более протективных антигенов. Тем не менее, вопрос об оптимальном составе бесклеточных коклюшных вакцин не решен, поскольку представляется неясным, какие именно составляющие являются ведущими в формировании противококлюшного иммунитета. В связи с этим представляется необходимой максимально полная доклиническая оценка потенциальных кандидатов в вакцины календаря прививок в сравнении с цельноклеточным аналогом, эпидемиологическая эффективность которого подтверждена сорокалетней практикой.

В Пермском филиале ФГУП НПО «Микроген» МЗ РФ «Пермское НПО «Биомед» на основе базовых исследований Л.И. Райхера с сотрудниками (1970-1989 гг) разработана технология получения бесклеточного коклюшного препарата на основе комплекса соматических антигенов коклюшного микроба (патент РФ 2332231).

Целью настоящей работы явилось проведение лабораторно-экспериментального (доклинического) исследования иммунобиологических свойств разработанного бесклеточного коклюшного препарата.

Основные задачи исследования

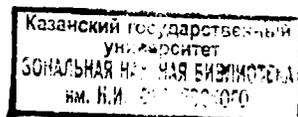
1. Оценить токсичность и аллергизирующее действие бесклеточного коклюшного препарата.
2. Изучить иммуногенность бесклеточного коклюшного препарата на экспериментальных животных.
3. Сконструировать комбинированную вакцину для профилактики дифтерии, столбняка и коклюша с использованием бесклеточного коклюшного компонента и оценить ее иммуногенность на экспериментальных животных.

Научная новизна. Впервые проведена комплексная оценка токсичности и иммуногенной активности отечественного бесклеточного коклюшного препарата в сравнении с используемой цельноклеточной вакциной. В экспериментах показано отсутствие у бесклеточной коклюшной вакцины токсичности, аллергизирующей, гистаминсенсибилизирующей и лейкоцитозстимулирующей активностей. Новая бесклеточная коклюшная вакцина подобно цельноклеточной защищает мышей от интрацеребрального заражения вирулентным штаммом *Bordetella pertussis* 18323, вызывает образование специфических антител, повышает пролиферативный ответ лимфоцитов в культурах с коклюшной суспензией, обеспечивает протективную активность в тесте сингенного переноса спленоцитов. Протективная активность и аффинность антител, образующихся в ответ на иммунизацию бесклеточным и цельноклеточным препаратами, оказались сходными. Пролиферативный ответ лимфоцитов *in vitro* на фитогемагглютинин после иммунизации бесклеточной коклюшной вакциной выше, чем после иммунизации цельноклеточной. Патоморфологические исследования показали значительно меньшую степень выраженности вторичной альтерации в тесте гиперчувствительности при введении бесклеточного препарата.

Теоретическое и практическое значение работы.

Полученные результаты уточняют представления о природе приобретённой противокклюшной резистентности. Принципиально важно, что новая бесклеточная коклюшная вакцина обладает сходной с традиционной цельноклеточной вакциной протективной активностью и иммуногенностью при меньшей токсичности.

Проведенные исследования – существенная часть доклинических испытаний новых вакцин на пути их продвижения в практику, в частности, для представления в Государственный Институт стандартизации и контроля им. Л.И. Тарасевича. Результаты исследований используются в лекционных курсах "Иммунология", "Экспериментальная иммунопатология и иммунотерапия" кафедры микробиологии и иммунологии ГОУ ВПО "Пермский государственный университет" (614600, г. Пермь, ул. Букирева, 15). В лекционном курсе «Биотехнология» кафедры промышленной технологии лекарств с курсом биотехнологии ГОУ ВПО "Пермская государственная фармацевтическая академия" (614990, г. Пермь, ул. Ленина, 48).



Основные положения, выносимые на защиту

1. Бесклеточный коклюшный препарат обладает более низкой токсичностью и аллергизирующей активностью в сравнении с цельноклеточной вакциной.

2. Новая бесклеточная коклюшная вакцина подобно цельноклеточной защищает мышей от интрацеребрального заражения вирулентным штаммом *Bordetella pertussis* 18323 и формирует клетки иммунологической памяти, которые функционируют при сингенном переносе протективного иммунитета.

3. Бесклеточная и традиционная цельноклеточная коклюшные вакцины обладают сопоставимой способностью к индукции иммунного ответа. Стимулирующее влияние бесклеточного препарата на пролиферацию Т-лимфоцитов в культурах с фитогемагглютинином более выражено, а проявления вторичной альтерации при реакции гиперчувствительности менее значительны.

4. Замена в вакцине АКДС цельноклеточного коклюшного компонента на новый бесклеточный создает новую комбинированную вакцину, которая не уступает традиционной по иммуногенной активности.

Апробация работы и публикации. Основные положения работы доложены на Межрегиональной конференции молодых ученых «Современные проблемы экологии, микробиологии и иммунологии», Пермь, 2002; Международной конференции молодых ученых «Биология – наука XXI века», Пушкино, 2004; Международной научной конференции «Студент и научно-технический прогресс», Новосибирск, 2005; Всероссийской научно-практической конференции «Создание и перспективы применения медицинских иммунобиологических препаратов», Пермь, 2008; Объединенном иммунологическом форуме, Санкт-Петербург, 2008. По материалам диссертации опубликовано 11 научных работ.

Объем и структура диссертации. Работа изложена на 118 стр. машинописного текста, содержит 28 таблиц и 10 рисунков. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, трех глав экспериментальных исследований, обсуждения, выводов, списка цитируемой литературы, включающего 149 источников литературы, из них 37 отечественных и 112 иностранных авторов.

Связь работы с научными программами. Диссертационная работа выполнена в соответствии с основным планом НИР Института экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН (номер госрегистрации темы 01.9.70 009928) и Филиала государственного унитарного предприятия «НПО «Микроген» Минздрава России «Пермское НПО «Биомед».

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы.

Вакцинные препараты. В работе использовали бесклеточный и цельноклеточный коклюшные препараты производства филиала ФГУП НПО «Микроген» «Пермское НПО «Биомед» (рис. 1.).



Рис 1. Схема получения цельноклеточного и бесклеточного коклюшных препаратов.

Кроме того, в работе использованы коммерческие комбинированные вакцины: АКДС, содержащая цельноклеточный коклюшный компонент, и Инфанрикс (ГласкоСмитКляйн, Бельгия) с бесклеточным коклюшным компонентом, а также экспериментальная вакцина аАКДС, в которой цельноклеточный коклюшный компонент был заменён на бесклеточный. В работе были использованы следующие отраслевые стандарты: ОСО-3 (иммуногенности коклюшной вакцины), ОСО-5 (гистаминсенсibilизирующей активности коклюшной вакцины).

Экспериментальные животные. Экспериментальные исследования в системе *in vivo* выполнены на 600 белых аутбредных мышцах-самцах массой 16-18 г (цех лабораторных животных филиала «Пермское НПО «Биомед»), 640 самцах-гибридах первого поколения мышей линий (СВА×С57BL/J6) F_1 (Питомник РАМН «Столбовая») массой 10 – 12 г, 200 самцах мышей линии BALB/c (Питомник РАМН «Столбовая») массой 14 - 16 г, 150 нелинейных морских свинок массой 250 - 300 г. Животных содержали в условиях лабораторного вивария на стандартной диете.

Токсичность и аллергизирующая активность. Опыты по исследованию острой и хронической токсичности препарата проводили согласно основным положениям РД 42-28-8-89 «Доклинические испытания новых медицинских иммунобиологических препаратов» (М., 1989).

Исследование токсичности в тесте изменения массы мышей, определение гистаминсенсibilизирующей и лейкоцитозстимулирующей активности прово-

дили согласно «Инструкции по отбору, проверке и хранению производственных штаммов коклюшных бактерий» (М., 1987).

Аллергизирующее действие препарата оценивали в тесте гиперчувствительности немедленного типа (ГНТ). Мышам вводили внутривнутрибрюшинно вакцинную дозу цельноклеточного (10 млрд) и бесклеточного препаратов (0,15 мг). Через 7 суток вводили удвоенную дозу препаратов, учет числа выживших животных вели через 24 ч после повторного введения.

Протективную активность коклюшных препаратов определяли в тесте внутримозгового заражения иммунизированных мышей вирулентным штаммом *B. pertussis* 18323. Заражающая доза вирулентного штамма составляла не менее 100 LD₅₀.

Гуморальный иммунный ответ оценивали в опытах на морских свинках и кроликах. Титр коклюшных антител в сыворотках животных определяли в реакции агглютинации (РА) и с помощью иммуноферментного анализа (ИФА) с использованием тест-систем, разработанных в филиале ФГУП НПО «Микроген» «Пермское НПО «Биомед» (Николаева, 2003).

Протективную активность коклюшных антител оценивали в реакциях пассивной защиты и нейтрализации. Тест пассивной защиты проводили на белых аутбредных мышах, которым предварительно вводили внутривенно различные разведения сывороток, определяя дозу сыворотки (ЕД₅₀), защищающей 50% мышей от заражения 450-500 LD₅₀ вирулентного штамма *B. pertussis* 18323. Реакцию нейтрализации проводили по следующей схеме: последовательные разведения вирулентного штамма *B. pertussis* 18323 инкубировали с сыворотками в течение 30 мин, затем интрацеребрально вводили белым аутбредным мышам. Рассчитывали число LD₅₀ штамма *B. pertussis* 18323, нейтрализованного сывороткой. Аффинность антител оценивали иммуноферментным методом, используя для отмывки 8М раствор мочевины (Kashanian *et al.*, 2008). Индекс аффинности (ИА) рассчитывали по формуле $ИА = (ОП2/ОП1) \times 100\%$, где ОП1 – оптическая плотность лунок промытых буферным раствором, ОП2 – оптическая плотность лунок промытых раствором мочевины.

Пролиферативный ответ лимфоцитов. Выраженность иммунного ответа по пролиферативной активности лимфоцитов крови оценивали в культуре клеток, содержащей 2×10^5 лейкоцитов/лунку, общий объем культуры - 0,2 мл. В качестве антигена использовали коклюшную суспензию в концентрации 50 млрд/мл. Через 72 ч учитывали включение ³H-тимидина на счетчике Wallac 1414 WinSpectral DSA Guardian (США) в подразделении радиоизотопных исследований аналитической лаборатории ИЭГМ УрО РАН. Для дополнительной оценки иммуномодулирующего действия вакцинных препаратов у тех же животных проводили оценку бласттрансформации лимфоцитов в культурах с фитогемагглютинином-П (ФГА, Sigma, L-9132, США в концентрациях 5; 10; 20 мкг/мл).

Адоптивный перенос иммунитета. Способность к накоплению клеток иммунологической памяти и эффекторных клеток характеризовали тесте адоптивного переноса иммунитета на мышах линии BALB/c. Спленоциты мышей-доноров, полученные на 14-е сутки после однократного введения препаратов в вакцинальной дозе, вводили мышам-реципиентам внутрибрюшинно в дозе 3×10^6 клеток. На следующие сутки животных-реципиентов заражали вирулентной культурой *B. pertussis* 18323 (100 LD₅₀). Через 14 суток определяли процент выживаемости в группах животных.

Гиперчувствительность замедленного типа. С учетом важной роли реакций Th1-типа в иммунитете при коклюше исследовали способность вакцинных препаратов к индукции реакции гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ). При постановке ГЗТ вакцины вводили в подушечку стопы правой лапы в объеме 0,03 мл, в левую стопу вводили аналогичное количество изотонического раствора натрия хлорида. Повторное введение осуществляли через 7 суток. Учет результатов проводили через 24 ч по степени выраженности иммунного воспаления. Рассчитывали индекс реакции по формуле: $(P_o - P_k) / P_k \times 100\% = \text{ИР}$, где P_o - показатели массы и толщины в опытной конечности; P_k - то же в контрольной конечности. Исследование патоморфологических изменений проводили совместно с зав. кафедрой патологической анатомии ГОУ ВПО "Пермская государственная медицинская академия им. акад. Е.А. Вагнера", д.м.н., профессором Г.Г. Фрейнд и к.м.н., доцентом той же кафедры А.Н. Крючковым. Парафиновые срезы окрашивали гематоксилином и эозином. Для дополнительной оценки возможности развития других типов реакций гиперчувствительности исследовали выраженность воспаления через 6 ч после разрешающей инъекции антигена.

Статистический анализ результатов. Полученный материал обрабатывали с помощью методов вариационной статистики. Результаты в большинстве таблиц и на рисунках представлены в виде средней арифметической и ее стандартной ошибки ($M \pm m$). Достоверность различий между двумя группами оценивали по непарному *t*-критерию Стьюдента. При множественных сравнениях использовали критерий Ньюмена-Кейлса. Различия или показатели связи считались значимыми при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Изучение токсичности и алергизирующего действия бесклеточной коклюшной вакцины

При изучении бесклеточной коклюшной вакцины в тесте острой токсичности установлено, что при однократном внутрибрюшинном введении белым мышам и морским свинкам вакцинальной дозы препарата не наблюдается снижения массы тела, образования воспалительных экссудатов, некробиотических

изменений. Применение бесклеточной вакцины при ежедневном внутримышечном введении в течение 10 дней в суммарной дозе 5,46 мкг для белых мышей, 36,56 мкг для морских свинок не вызывает гибели животных, изменения поведенческой и двигательной активности, снижения массы тела, что свидетельствует об отсутствии токсического действия препарата.

Согласно требованиям ВОЗ проведена сравнительная оценка токсичности бесклеточного и цельноклеточного коклюшных препаратов в тесте изменения массы мышей. Полученные результаты показывают, что все изученные вакцины соответствуют требованиям, предъявляемым к препаратам данного класса: прирост массы по отношению к контрольным животным составляет более 60% (табл. 1). В группе животных, получавших бесклеточный препарат, прирост массы выше, чем в группе животных, в которой использовали цельноклеточный препарат, что позволяет сделать вывод о меньшей токсичности бесклеточного препарата ($p < 0,05$).

Таблица 1

Характеристика токсических свойств бесклеточной вакцины в тестах изменения массы мышей и лейкоцитозстимулирующей активности

| № серии препарата | Относительный прирост, % | | Число лейкоцитов $\times 10^3/\text{мл}$ | | | |
|-------------------|--------------------------|------------------------|--|------------------------|-------------------|-------------------|
| | бесклеточная вакцина | корпускулярная вакцина | бесклеточная вакцина | корпускулярная вакцина | 0,9% раствор NaCl | ОСО-3 |
| 1 | 111,0 | 91,8 | 5,76 | 19,36 | 4,50 | 22,72 |
| 2 | 100,9 | 85,7 | 4,64 | 20,48 | 3,00 | 21,44 |
| 3 | 101,0 | 87,0 | 3,68 | 20,00 | 4,12 | 24,96 |
| 4 | 93,7 | 90,4 | 5,44 | 24,00 | 3,75 | 47,36 |
| 5 | 97,8 | 76,1 | 6,08 | 19,36 | 5,44 | 23,68 |
| 6 | 100,2 | 73,4 | 3,68 | 23,52 | 4,25 | 30,40, |
| 7 | 95,7 | 72,1 | 4,48 | 19,20 | 3,70 | 22,40 |
| 8 | 110,0 | 69,3 | 4,16 | 12,16 | 4,52 | 21,76 |
| 9 | - | - | 5,12 | 17,76 | 3,16 | 29,28 |
| 10 | - | - | 7,84 | 23,52 | 4,86 | 30,88 |
| M \pm m | 101,3 $\pm 2,2$ | 80,7 \pm 2,3 | 5,1 \pm 0,3 | 19,9 \pm 1,2 | 4,1 \pm 0,3 | 27,5 \pm 2,7 |
| ЛСА* | - | - | 0,19 | 0,73 | 0,15 | - |

Примечание. * - лейкоцитозстимулирующая активность по отношению к отраслевому стандартному образцу (ОСО-3).

Одной из характеристик токсичности коклюшных вакцинных препаратов является их способность вызывать лейкоцитоз, что связано с наличием недообезвреженного коклюшного токсина. Как видно из табл. 1, введение бесклеточного препарата практически не вызывает увеличения количества лейкоцитов.

В сравнении с цельноклеточной вакциной и отраслевым стандартным образцом (ОСО-5), бесклеточная вакцина не проявляет фармакотоксическую гистаминсенсibiliзирующую активность, также обусловленную недообезвреженным коклюшным токсином.

Из представленных данных видно (табл. 2), что не одна из изученных доз бесклеточного препарата не вызывает сенсibiliзации к действию гистамина.

Таблица 2

Гистаминсенсibiliзирующая активность исследуемых препаратов

| Препарат | Разведение | Количество животных в опыте | |
|-----------------|--------------|-----------------------------|----------|
| | | взято | выживших |
| ОСО-5 | 20 МОЕ/мл | 5 | 0 |
| | 5 МОЕ/мл | 5 | 1 |
| | 1 МОЕ/мл | 5 | 3 |
| Бесклеточный | 1 мг/мл | 5 | 5 |
| | 0,2 мг/мл | 5 | 5 |
| | 0,04 мг/мл | 5 | 5 |
| | 20 МОЕ – 1мл | 5 | 2 |
| Цельноклеточный | 5 МОЕ – 1мл | 5 | 4 |
| | 1 МОЕ – 1мл | 5 | 5 |

Применение вакцинных препаратов может приводить к развитию сенсibiliзации и аллергических реакций немедленного типа. Установлено, что сенсibiliзирующий эффект бесклеточного препарата значительно меньше, в сравнении с цельноклеточной вакциной (табл. 3).

Таблица 3

Аллергизирующее действие коклюшных препаратов

| Препарат | Выживаемость (%) в тесте ГНТ |
|-----------------|------------------------------|
| Бесклеточный | 100,0 |
| Цельноклеточный | 27,7* |

Примечание. * - $p < 0,01$ по t -критерию Стьюдента для долей.

Исследование иммуногенной активности бесклеточного коклюшного препарата

Бесклеточная коклюшная вакцина проявляет стабильную протективную активность, которая, судя по доле выживших иммунизированных и заражённых в мозг мышей, не уступает активности цельноклеточного препарата (табл. 4).

Таблица 4

Сравнительная оценка протективной активности коклюшных вакцин

| № серии препарата | Выживаемость, % | |
|-------------------|--------------------------|-----------------------|
| | цельноклеточный препарат | бесклеточный препарат |
| 1 | 62,5 | 100,0 |
| 2 | 75,0 | 88,2 |
| 3 | 83,3 | 87,5 |
| 4 | 62,5 | 75,0 |
| 5 | 93,3 | 83,3 |
| 6 | 76,9 | 93,3 |
| 7 | 81,3 | 93,8 |
| 8 | 87,5 | 86,6 |
| M±m | 77,8±4,5 | 88,5±3,1 |

Примечание. В каждой группе исходно 14 мышей. При определении выживших исключали мышей, павших в течение первых 72 ч после заражения.

Способность к накоплению клеток иммунологической памяти и эффекторных клеток характеризовали в тесте адоптивного переноса иммунитета. Адоптивный перенос противокклюшного иммунитета был воспроизведён как с цельноклеточной, так и с бесклеточной вакцинами (табл. 5). Однако перенос спленоцитов от доноров, получивших гель алюминия гидроксида без вакцины, не вызывал у мышей-реципиентов резистентность к внутримозговому заражению коклюшными бактериями.

Таблица 5

Показатель выживаемости в тесте адоптивного переноса иммунитета

| Препарат | Число реципиентов | Число животных павших вследствие неспецифической гибели | Число выживших животных | Процент выживаемости |
|--------------------------|-------------------|---|-------------------------|----------------------|
| Корпускулярный | 14 | 4 | 7 | 70 |
| Бесклеточный | 14 | 2 | 8 | 66,6 |
| Гель Al(OH) ₃ | 14 | 4 | 0 | 0 |

Полученные данные указывают на то, что при иммунизации исследуемыми коклюшными препаратами формируется состояние иммунной резистентности, защищающее животных-реципиентов от интрацеребрального заражения вирулентной культурой *B. pertussis* 18323.

Иммунизация экспериментальных животных бесклеточной коклюшной вакциной вызывает образование антител, которое по титрам в РА и ИФА не отличается от ответа на цельноклеточную (табл. 6).

Таблица 6

Уровень антител в сыворотках крови морских свинок, иммунизированных бесклеточным, цельноклеточным препаратами и ОСО-3

| Препарат | Уровень антител (средняя геометрическая титра) | | | | | |
|----------------|--|----------------------------|------------------------------|---------------------------|----------------------------|------------------------------|
| | после первой прививки | | | после второй прививки | | |
| | РА* | ИФА** | | РА* | ИФА** | |
| | | бесклеточный иммуносорбент | корпускулярный иммуносорбент | | бесклеточный иммуносорбент | корпускулярный иммуносорбент |
| Бесклеточный | 174,5 [71,1-428,3] | 92,9 [51,8-166,9] | 47,8 [21,3-107,3] | 1522,19 [643,7-3599,4] | 228,5 [166,6-213,4] | 221,1 [159,4-306,6] |
| Корпускулярный | 190,3 [35,2-1027,2] | 70,88 [19,2-261,2] | 52,6 [15,5-178,9] | 1522,19 [725,3-3194,5] | 216,6 [122,4-383,4] | 206,1 [123,5-343,9] |
| ОСО-3 | 439,1 [85,2-2262,9] | 47,7 [15,8-143,8] | 46,5 [19,6-110,7] | 1076,35 [373,0-3105,8] | 138,9 [77,2-150,1] | 219,2 [143,2-335,6] |

* - величина обратная разведению; ** - условные иммуноферментные единицы.

Можно с уверенностью предполагать сходство репертуара специфичностей образующихся антител. Сыворотки кроликов, иммунизированных бесклеточной коклюшной вакциной пассивно защищают мышей также, как сыворотки кроликов, иммунизированных цельноклеточной (табл. 7), однако уступают последним в опытах нейтрализации заражающей дозы *B. pertussis in vitro* (табл. 7).

Как видно из табл. 7, ЕД₅₀ сывороток кроликов, иммунизированных как бесклеточной, так и цельноклеточной вакциной, равна 0,029 мл. Максимальная доза (0,5 мл) сыворотки кроликов, иммунизированных бесклеточной вакциной нейтрализует *in vitro* 22,34 LD₅₀ *B. pertussis*, в то же время сыворотка кроликов, иммунизированных цельноклеточной вакциной нейтрализует *in vitro* 58,77 LD₅₀.

Установлено, что аффинность антител, вырабатываемых при использовании цельноклеточного и бесклеточного препарата, не отличается (табл. 8).

Таблица 7

Характеристика протективных свойств противоклоушных сывороток в тестах пассивной защиты и реакции нейтрализации

| Препарат | Пассивная защита | | | | Реакция нейтрализации | | | |
|------------------------|------------------|-----------------------------|------------------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------------|------------------------------|-------------------------|
| | объем сыворотки | количество животных в опыте | количество выживших животных | ЕД ₅₀ , мл | кол-во клеток | количество животных в опыте | количество выживших животных | Кол-во LD ₅₀ |
| Бесклеточная вакцина | 1 | 10 | 8 | 0,029 | 100000 | 10 | 0 | 22,34 |
| | 0,2 | 10 | 5 | | 20000 | 10 | 3 | |
| | 0,004 | 10 | 4 | | 4000 | 10 | 8 | |
| | 0,0008 | 10 | 0 | | 800 | 10 | 7 | |
| | | 160 | 10 | | 9 | | | |
| Корпускулярная вакцина | 1 | 10 | 7 | 0,029 | 100000 | 10 | 3 | 58,77 |
| | 0,2 | 10 | 5 | | 20000 | 10 | 5 | |
| | 0,004 | 10 | 3 | | 4000 | 10 | 7 | |
| | 0,0008 | 10 | 2 | | 800 | 10 | 8 | |
| | | 160 | 10 | | 10 | | | |
| Неиммунная сыворотка | 1 | 10 | 2 | - | 100000 | 10 | 0 | - |
| | 0,2 | 10 | 1 | | 20000 | 10 | 0 | |
| | 0,004 | 10 | 0 | | 4000 | 10 | 1 | |
| | 0,0008 | 10 | 0 | | 800 | 10 | 3 | |
| | | 160 | 10 | | 6 | | | |

Таблица 8

Сравнительная оценка аффинности антител

| Иммуносорбент | Индекс аффинности, % | |
|-----------------|---------------------------------------|------------------------------------|
| | антитела к цельноклеточному препарату | антитела к бесклеточному препарату |
| Цельноклеточный | 85,0±4,1 | 73,2±6,2 |
| Бесклеточный | 74,3±6,1 | 84,3±4,3 |

Учитывая важную роль клеточного звена иммунного ответа, в развитии противокклюшного иммунитета, провели оценку влияния коклюшных вакцин на пролиферативный ответ лимфоцитов в культурах с Т-клеточным митогеном на 14-е сутки после вакцинации. Мононуклеарные клетки крови морских свинок культивировали в присутствии разных концентраций ФГА и без стимуляции. Установлено, что уровень пролиферативного ответа животных, иммунизированных коклюшными препаратами, в культурах с внесением разных концентраций ФГА достоверно выше, чем в контроле. Как видно из табл. 9, иммуномодулирующая активность бесклеточного препарата более выражена в культурах с концентрацией ФГА 20 мкг/мл. Полученные результаты важны для обоснования используемых рядом авторов иммунотерапевтических подходов при неинфекционных заболеваниях с использованием вакцин *B. pertussis*.

Для дополнительной характеристики развивающегося иммунного ответа мононуклеарные клетки крови морских свинок, иммунизированных цельноклеточным и бесклеточным препаратами, культивировали в присутствии взвеси клеток *B. pertussis*.

Таблица 9

Иммуномодулирующая активность коклюшных препаратов в реакции бласттрансформации лимфоцитов с Т-клеточным митогеном

| Препарат | Концентрация ФГА | | | |
|-----------------|------------------|---------|---------|--------------|
| | 20 мкг | 10 мкг | 5 мкг | без митогена |
| Цельноклеточный | 4,0757± | 3,9083± | 3,6912± | 3,4134± |
| | 0,2720* | 0,3424* | 0,3005* | 0,1200* |
| | (11905) | (8096) | (4911) | (2591) |
| Бесклеточный | 4,4665± | 4,2128± | 3,7599± | 3,6671± |
| | 0,0468** | 0,0911* | 0,1868* | 0,0658* |
| | (29275) | (16325) | (5754) | (4646) |
| Контроль | 2,9527± | 3,2292± | 3,2693± | 2,3131± |
| | 0,0809 | 0,0555 | 0,0394 | 0,0352 |
| | (897) | (1695) | (1859) | (205) |

Примечание. Приведены значения $M \pm m$ для показателей \log_{10} имп/мин, в скобках – средняя геометрическая имп/мин; * – $p < 0,05$ по отношению к контролю; # – $p < 0,05$ по отношению к цельноклеточному препарату.

Показано, что уровень пролиферативного ответа в группах, иммунизированных коклюшными препаратами, отличается от контрольной группы. При этом не отмечается достоверного отличия уровня пролиферативной активности в ответ на стимуляцию коклюшной суспензией у животных, иммунизированных цельноклеточным и бесклеточным препаратами (табл. 10).

Таблица 10

Пролиферативный ответ лимфоцитов морских свинок, иммунизированных коклюшными вакцинами, на взвесь коклюшных бактерий *in vitro*

| Антиген | Препарат иммунизации | | |
|---------------------|----------------------|--------------------|-----------------|
| | цельноклеточный | бесклеточный | контроль |
| Коклюшная суспензия | 3,9906± | 4,1624± | 2,3131± |
| | 0,3238* (9787) | 0,0672* (14535) | 0,0435 (206) |
| Без антигена | 3,4134± | 3,6671± | 2,3131± |
| | 0,1200* (2591) | 0,0658* (4646) | 0,0352 (205) |

Примечание. Приведены значения $M \pm m$ для показателей \log_{10} имп/мин; в скобках – средняя геометрическая имп/мин; * – $p < 0,05$ по отношению к контролю.

Отсутствие значимых отличий в уровне пролиферативной активности, вызванной бесклеточным и цельноклеточным препаратами, позволяет говорить об их сопоставимой иммуногенности. Обращает на себя внимание повышение спонтанной пролиферации лимфоцитов в культурах без антигена, что, по-видимому, является отражением стимуляции лимфоцитов *in vivo*.

Выраженность клеточноопосредованного иммунного ответа оценивали в реакции ГЗТ. Установлено, что использование цельноклеточной вакцины вызывает более выраженное иммунное воспаление в сравнении с бесклеточным препаратом (табл. 11).

Таблица 11

Выраженность иммунного воспаления через 24 ч после разрешающей инъекции антигена

| Препарат | Индекс реакции ($M \pm m$) | |
|-----------------|------------------------------|----------------|
| | по толщине стопы | по массе стопы |
| Бесклеточный | 37,3±3,3 | 16,9±3,5 |
| Цельноклеточный | 46,9±2,9 | 33,0±5,0 |
| <i>p</i> | <0,05 | <0,05 |

Для интегральной характеристики процессов рекрутирования иммунокомпетентных клеток в регионарный лимфатический узел и их пролиферации *in situ* исследовали изменение клеточности и массы подколленных лимфатических узлов. Установлено, что выраженность ответа со стороны периферических органов иммунной системы сопоставима в сравниваемых группах (табл. 12).

Таблица 12

Выраженность изменения массы и клеточности регионарных лимфатических узлов

| Препарат | Индекс реакции ($M \pm m$) | |
|-----------------|------------------------------|-------------------------------------|
| | по массе лимфатических узлов | по количеству ядросодержащих клеток |
| Бесклеточный | 54,9±5,9 | 77,7±3,8 |
| Цельноклеточный | 56,0±2,9 | 82,91±1,3 |
| <i>p</i> | >0,05 | >0,05 |

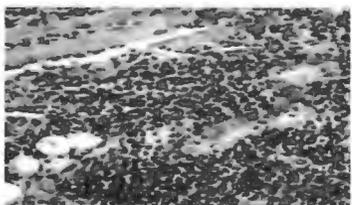
Дополнительные исследования показали, что при использовании исследуемых препаратов существенно отличается временная динамика развития воспалительного ответа. При введении цельноклеточной вакцины реакция достигает своего максимума через 6 ч, тогда как при использовании бесклеточной вакцины максимум ответа приходится на 24 ч. Морфологическое изучение зоны воспаления показало, что через 6 ч после иммунизации цельноклеточной вакциной в мягких тканях наблюдается обильный клеточный воспалительный инфильтрат вокруг мелких единичных очагов некроза волокнистой ткани и скелетных мышц. В центральных отделах инфильтрата преобладают нейтрофильные гранулоциты, многие из которых находятся в состоянии распада, в периферических участках инфильтрата доминируют гистиоциты (макрофаги). Встречаются также равномерно рассеянные немногочисленные эозинофильные гранулоциты (рис. 2). При иммунизации бесклеточным препаратом через 6 ч наблюдается очаговая обильная клеточная воспалительная инфильтрация смешанного характера. Индекс реакции по толщине стопы при использовании бесклеточной вакцины составляет 44,92±3,9, а корпускулярной - 56,9±8,1. Таким образом, выраженность в этот временной период воспалительного ответа, в генезе которого с учетом морфологической картины важная роль может принадлежать повреждению иммунными комплексами, ниже при использовании бесклеточной вакцины. Через 24 ч после иммунизации цельноклеточной вакциной отмечаются обширные некрозы мягких тканей, стенок сосудов. Центральные отделы инфильтрата образованы разрушающимися нейтрофильными грануло-

цитами (микроабсцессы) и макрофагами. В периферических отделах преобладают округлые и веретеновидные гистиоциты без признаков распада. Перифокальный отёк резко выражен (см. рис. 2).



Через 6 ч после разрешающей инъекции коклюшной суспензией, иммунизация тем же препаратом.

Гематоксилин и эозин, $\times 80$.



Через 24 ч после разрешающей инъекции коклюшной суспензией, иммунизация тем же препаратом.

Гематоксилин и эозин, $\times 80$.



Через 24 ч после разрешающей инъекции бесклеточным коклюшным препаратом, иммунизация тем же препаратом.

Гематоксилин и эозин, $\times 80$.

Рис. 2. Зона воспаления в стопе после разрешающего введения исследуемых препаратов.

Для мышей, иммунизированных бесклеточной вакциной, характерно преобладание в центральных отделах инфильтрата нейтрофильных гранулоцитов, а по периферии - макрофагов. Степень выраженности перифокального очагового отека варьирует от незначительного до умеренного. Выявляется полнокровные сосуды, единичные очаги кровоизлияний (см. рис. 2). Таким образом, в отличие от бесклеточного препарата воспалительный ответ при разрешающем введении цельноклеточной вакцины характеризуется более выраженными явлениями вторичной альтерации.

Получение и оценка иммуниобиологических свойств комбинированных вакцин с бесклеточным коклюшным компонентом

Новая бесклеточная коклюшная вакцина была включена как компонент в АКДС вместо цельноклеточной. Комбинированные вакцины аАКДС и АКДС

сравнивали между собой и с вакциной Инфанрикс, также содержащей бесклеточный коклюшный компонент. Результаты оценки гуморального ответа морских свинок на иммунизацию тремя комбинированными вакцинами представлены в табл. 13.

В то же время при выявлении коклюшных антител в ИФА на подложке иммобилизованной взвесью коклюшных бактерий или бесклеточным препаратом в сыворотках крови свинок, иммунизированных вакциной Инфанрикс, определялись достоверно меньшие титры, чем у животных, иммунизированных АКДС и аАКДС (табл. 13).

Содержание дифтерийных антител в сыворотках крови свинок, иммунизированных вакцинами аАКДС и Инфанрикс, было достоверно ниже, чем после иммунизации АКДС-вакциной, при этом обе вакцины с бесклеточным коклюшным компонентом не отличались по способности стимулировать образование антител к дифтерийному анатоксину. Титр столбнячных антител при иммунизации вакциной Инфанрикс был значимо ниже титров, полученных в ответ на иммунизацию АКДС и аАКДС вакцинами. Между средними титрами столбнячных антител в сыворотках крови свинок, иммунизированных вакцинами АКДС и аАКДС, достоверных отличий не обнаружено.

Таблица 13

Уровень специфических антител в сыворотках морских свинок, иммунизированных комбинированными вакцинами, с различными коклюшными компонентами

| Препарат | Уровень антител (средняя геометрическая титра) | | | | |
|-----------|--|---------------------------|---------------------------|----------------------|------------------------|
| | РА | коклюшных | | дифтерийных | столбнячных |
| | | ИФА | | | |
| | | бесклеточный антиген | коклюшная суспензия | | |
| аАКДС | 861,38 [380,62-1949,34] | 228,5 [166,6-213,4] | 206,01 [131,80-322,02] | 1,11 [0,62-1,98]* | 9,12 [5,41-15,38] |
| АКДС | 1493 [745,38-2991,11] | 512,75 [283,75-926,55] | 392,66 [210,08-733,92] | 3,55 [2,48-5,07] | 14,79 [10,04-21,80] |
| Инфанрикс | 951,03 [674,83-1340,29] | 39,55 [22,16-71,98]*# | 130,66 [91,29-187,06]* | 0,89 [052-1,53]* | 2,12 [1,44-3,11]*# |

Примечание. * - $p < 0,05$ в сравнении с группой, иммунизированной АКДС-вакциной; # - $p < 0,05$ в сравнении с группой, иммунизированной аАКДС-вакциной.

Считается, что в дополнение к выработке антител необходимо формирование клеточного иммунитета для обеспечения невосприимчивости к коклюшной инфекции (Matoo, Cherry, 2005). Поэтому оценка специфического клеточного иммунитета в виде реакции ГЗТ представляется нам весьма важной как в плане характеристики иммунобиологических свойств комбинированных вакцин, так и в отношении возможного использования полученных данных для контроля эффективности вакцинации. Установлено, что уровень иммунного воспаления при использовании АКДС-вакцины достоверно выше, в сравнении с вакцинами, содержащими бесклеточный коклюшный компонент (табл. 14). При этом уровень ответа со стороны регионарных лимфатических узлов сопоставим по своей выраженности (табл. 15).

Таблица 14

Выраженность иммунного воспаления через 24 ч после разрешающей инъекции антигена

| Препарат | Индекс реакции $M \pm m$ | |
|-----------|--------------------------|----------------|
| | по величине отека | по массе стопы |
| АКДС | 32,62±7,51 | 27,90±3,18 |
| аАКДС | 14,45±1,55* | 12,49±1,12* |
| Инфанрикс | 16,55±2,13* | 16,12±2,65* |

Примечание. * - $p < 0,05$ в сравнении с группой АКДС

Таблица 15

Выраженность изменения массы и клеточности регионарного лимфатического узла через 24 ч после разрешающей инъекции антигена

| Препарат | Индекс реакции $M \pm m$ | |
|-----------|--------------------------|---------------------|
| | по массе лимф. узлов | по количеству (ЯСК) |
| АКДС | 53,7±8,64 | 75,5±2,46 |
| аАКДС | 59,2±7,42 | 81,1±1,13 |
| Инфанрикс | 54,3±8,35 | 84,5±1,55 |

Примечание. * - $p < 0,05$ в сравнении с группой АКДС.

В сравнительном экспериментально-лабораторном (доклиническом) исследовании новой бесклеточной коклюшной вакцины установлена её безвредность и высокая протективная, а также иммуногенная активность. Результаты исследования позволяют рассматривать препарат в качестве кандидата для клинических испытаний I фазы.

ВЫВОДЫ

1. В экспериментах на животных установлено, что бесклеточная коклюшная вакцина нетоксична и не обладает сенсibiliзирующими свойствами.

2. Показано, что новая бесклеточная коклюшная вакцина подобно цельноклеточной защищает мышей от интрацеребрального заражения вирулентным штаммом *B. pertussis* 18323, а также способна формировать клетки иммунологической памяти, которые функционируют при сингенном переносе протективного иммунитета на модели внутримозговой коклюшной инфекции у мышей.

3. Установлено, что новая бесклеточная коклюшная вакцина не уступает цельноклеточной по способности стимулировать образование специфических антител. Показано, что аффинность антител, формирующихся в ответ на вакцинацию бесклеточным и цельноклеточным препаратами, не отличается.

4. Показано, что уровень пролиферации лимфоцитов в культурах с коклюшной суспензией при иммунизации животных бесклеточным и цельноклеточным препаратами, повышается в одинаковой степени в сравнении с контролем. Выраженность пролиферативного ответа лимфоцитов в культурах с оптимальной концентрацией фитогемагглютинина при иммунизации бесклеточной коклюшной вакциной выше, чем при введении цельноклеточного коклюшного препарата.

5. Установлено, что разрешающее введение цельноклеточной коклюшной вакцины при сенсibiliзации коклюшной суспензией или АКДС-вакциной в тесте гиперчувствительности вызывает более выраженные проявления вторичной альтерации в сравнении с бесклеточным препаратом.

6. Замена в вакцине АКДС цельноклеточного коклюшного компонента на новый бесклеточный создает новую комбинированную вакцину, которая не уступает традиционной по иммуногенной активности.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. Устюгов Я.Ю. Локальные иммунные и морфологические изменения при введении компонентов вакцины «Бубо-Кок» / Я.Ю. Устюгов, А.Н. Крючков, А.Ю. Увицкий, Л.Е. Увицкая // Современные проблемы экологии, микробиологии и иммунологии: Материалы межрегион. конф. молодых ученых – Пермь, 2002. – С. 105-106.
2. Устюгов Я.Ю. Морфологические и гистологические изменения при введении вариантов клеточной и бесклеточной противокклюшных вакцин / Я.Ю. Устюгов, А.Ю. Увицкий // Биология – наука XXI века: Материалы международной конф. молодых ученых – Пушкино, 2004. – С. 132.
3. Увицкий А.Ю. Изменения при введении комбинированных вакцин и их компонентов. / А.Ю. Увицкий, Я.Ю. Устюгов, А.М. Николаева, В.Д. Семенова // Медицинские иммунобиологические препараты в XXI веке: разработка, про-

изводство, применение: Материалы всерос. научн. конф. с междунар. участием - Уфа, 2005. - Часть 1. - С. 82-84.

4. Устюгов Я.Ю. Локальные морфологические изменения при введении корпускулярной противокклюшной вакцины. / Я.Ю. Устюгов, А.Ю. Увицкий // Студент и научно-технический прогресс: Материалы международной научной конференции серия биология НГУ. - Новосибирск, 2005. – С. 77-78.

5. Николаева А.М. Опыт разработки и доклинической оценки бесклеточного варианта противокклюшной вакцины. / А.М. Николаева, В.Д. Семенова, А.Ю. Увицкий, Я.Ю. Устюгов // Перспективы и проблемы развития биотехнологии в рамках единого экономического пространства стран содружества: Материалы международной научно-практич. конф. - Минск-Нарочь, 2005. – С. 155-156.

6. Увицкий А.Ю. Изучение иммуногенности бесклеточного варианта коклюшной вакцины в опытах на животных. / А.Ю. Увицкий, Я.Ю. Устюгов, В.Н. Сперанская // Современная вакцинопрофилактика: Материалы научно-практич. конф. – Пермь, 2005. – С. 113-117.

7. Увицкий А.Ю. Взаимная иммуноадывантность комбинированных вакцин, как причина усиления локальной реактогенности при повторном введении / А.Ю. Увицкий, Я.Ю. Устюгов, А.М. Николаева, В.Д. Семенова, А.Н. Крючков // Вестник уральской медицинской академической науки. – 2006. - № 3-1. – С. 245-248.

8. Устюгов Я.Ю. Изучение иммунобиологической активности варианта бесклеточной коклюшной вакцины / Я.Ю. Устюгов, А.Ю. Увицкий, А.М. Николаева, В.Д. Семенова // Вестник уральской медицинской академической науки. – 2006. - № 3-1. – С. 248-251.

9. Устюгов Я.Ю. Изучение иммуномодулирующего действия корпускулярного и ацеллюлярного коклюшных вакцинных препаратов в реакции бласттрансформации лимфоцитов / Я.Ю. Устюгов, А.М. Николаева // Российский иммунологический журнал. – 2008. - № 2-3. – С. 339.

10. Устюгов Я.Ю. Изучение влияния коклюшных вакцин на клеточный и гуморальный иммунный ответ у животных / Я.Ю. Устюгов, А.М. Николаева, Л.Е. Увицкая // Создание и перспективы применения медицинских иммунобиологических препаратов: Материалы всерос. научно-практич. конф. – Пермь, 2008. – С. 21-22.

11. Устюгов Я.Ю. Протективная активность бесклеточной коклюшной вакцины в тесте адоптивного переноса иммунитета / Я.Ю. Устюгов, А.М. Николаева, // Создание и перспективы применения медицинских иммунобиологических препаратов: Материалы всерос. научно-практич. конф. – Пермь, 2008. – С. 23-24.

Подписано в печать 01.10.2008. Усл. печ. л. 1,0.
Формат 90×60/16. Набор компьютерный. Тираж 100 экз.
Заказ № 732/2006.

Отпечатано в ИД «Пресстайм»
Адрес: 614025, г. Пермь, ул. Героев Хасана, 105

18-