

Фундаментальні дослідження

УДК: 616.921.5:615.371:615.076(047.31)

ОСОБЛИВОСТІ БІЛКОВОГО СКЛАДУ ТА ІМУНОГЕННІСТЬ АКТУАЛЬНИХ ПРОТИГРИПОЗНИХ ВАКЦИН

*А. Ю. Волянський, О. А. Романова, Т. А. Сидоренко, Н. І. Ігумнова, В. І. Юхименко,
Н. В. Кашир, А. В. Мартинов*

ДУ «Інститут мікробіології та імунології імені І. І. Мечникова АМН України», Україна

Проведено вивчення імуногенності та основних характеристик білкових складових новостворених вакцин проти вірусу грипу А(Н1N1) Паненза та МоноГриппол. Виявлено кількісний і якісний склад білків обох вакцин: п'яти – розщепленої вакцини Паненза, двох – субодиночної вакцини МоноГриппол. Встановлено, що імуногенність досліджуваної субодиночної ад'ювантної вакцини є удвічі вищою, ніж вірусно-розщепленої, що не містить ад'юванту.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: протигрипозні вакцини, імуногенність, білковий склад

ОСОБЕННОСТИ БЕЛКОВОГО СОСТАВА И ИММУНОГЕННОСТЬ АКТУАЛЬНЫХ ПРОТИВОГРИППОЗНЫХ ВАКЦИН

*А. Ю. Волянський, Е. А. Романова, Т. А. Сидоренко, Н. И. Игумнова, В. И. Юхименко,
Н. В. Кашир, А. В. Мартынов*

ГУ «Институт микробиологии и иммунологии имени И. И. Мечникова АМН Украины», Украина

Проведено изучение иммуногенности и основных характеристик белковых составляющих новых вакцин против вируса гриппа А(Н1N1) Паненза и МоноГриппол. Выявлен количественный и качественный состав белков обеих вакцин: пяти – расщепленной вакцины Паненза, двух – субъединичной вакцины МоноГриппол. Установлено, что иммуногенность исследованной субъединичной адьювантной вакцины вдвое превышает иммуногенность вирусно-расщепленной, не содержащей адьюванта.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: противогриппозные вакцины, иммуногенность, белковый состав

FEATURES OF PROTEIN STRUCTURE AND THE IMMUNOGENICITY OF ACTUAL INFLUENZA VACCINES

*A. Yu. Volyanskiy, E. A. Romanova, T. A. Sydorenko, N. I. Igumnova, V. I. Yuchimenko,
N. V. Kashpur, A. V. Martynov*

State institution «I.Mechnikov Institute of Microbiology and Immunology of Ukrainian Medical Sciences Academy», Ukraine

Immunogenicity and the basic characteristics of albuminous components of new vaccines against a virus of influenza A (H1N1) by Panenza and MonoGrippol were investigated. The quantitative and qualitative structure of proteins of both vaccines is revealed: five – the split vaccine of Panenza, two – subisolated vaccines of MonoGrippol. It was established that the immunogenicity of investigated subisolated adjuvant vaccine twice exceeds an immunogenicity of viral-split nonadjuvant vaccine.

KEY WORDS: vaccines against a virus of influenza, immunogenicity, albuminous composition

Найважливішими характеристиками грипу, що викликає вірус типу А(Н1N1), є епідемічна природа захворювання та висока смертність в умовах пандемії. Небезпечність грипу пов'язана з високою частотою розвитку суперінфекцій, що призводять до легене-

вих та серцевих ускладнень, особливо серед імунокомпрометованих пацієнтів та осіб похилого віку. Найефективнішим способом запобігання тяжким наслідкам грипу і значним економічним втратам є вакцинація осіб з груп ризику до початку епідемії.

Обговорюючи протигрипозні вакцини, необхідно зазначити важливу особливість вірусу грипу – стрімку та непередбачувану можливість змінюватись за рахунок обміну генами між вірусами. Антигенний дрейф, що відбувається, виникає внаслідок точкових мутацій, головним чином, у молекулах поверхневих вірусних білків – гемаглютиніну (ГА) та нейрамінідази (НА). За виготовлення сучасних протигрипозних інактивованих вакцин оболонки віріонів руйнують детергентами, і отриманий таким чином препарат використовується як «розщеплена» вакцина. З грипозних вірусних часточок виділяють також поверхневі антигени (ГА та НА), які можна розглядати як основу субодиночних хімічних вакцин [1].

Вимоги Європейської Фармакопеї до складу вакцин неоднакові щодо субодиночних і розщеплених вакцин. Загальний вміст білку у розщеплених вакцинах не повинен перевищувати 100 мкг на один використаний штамп і, відповідно, на одну дозу щодо моновалентних вакцин, щодо субодиночних вакцин цей показник становить 80 мкг. У складі субодиночних вакцин дозволяється не більше 40 мкг іншого, ніж ГА, білку на один вірусний штамп [2].

Протягом 2009 року, за підготовки до очікуваної пандемії грипу А(Н1N1), у світі було створено близько 20 нових протигрипозних вакцин.

Дослідження проведено в рамках науково-дослідної роботи «Взаємозв'язок імуногенності актуальних протигрипозних вакцин з особливостями їх нуклеопротеїдного складу», № держреєстрації 0110U001418.

Метою даного дослідження було визначення імуногенності та основних характеристик білкових складових деяких новостворених протипандемічних вакцин.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

Експерименти були проведені на 216 безпорідних дорослих білих мишах вагою 20–22 г.

Об'єктом дослідження було обрано вакцини «Паненза» (Санофі Пастер, Франція) та «МоноГриппол» (ООО «Петровакс», НДІ вакцин та сироваток, Санкт-Петербург, Росія). Препарат «Паненза» являє собою інактивовану моновалентну розщеплену безад'ювантну вакцину проти вірусу грипу А(Н1N1), що містить 15 мкг ГА ізольованого штаму вірусу А/California/07/2009 (Н1N1) на дозу. В індивідуальних формах випуску не містить консерванту, протипоказана особам з підтвердженою тяжкою гіперчутливістю до яєчного білку, який входить до

складу вакцини. «МоноГриппол» є інактивованою рекомбінантною моновалентною субодиночною ад'ювантною вакциною проти А(Н1N1), технологія конструювання якої використовує безпечну виробку на культурі клітин кишкової палички (на відміну від курячих ембріонів). Для одержання злитих вірусних протеїнів-антигенів застосовуються білки теплового шоку бактерій. Окрім безпечності вакцини для людей з алергією на курячий білок, за рахунок теплового шоку покращується презентація вірусних антигенів.

Піддослідних тварин одно- або дворазово імунізували препаратами, формуючи наступні групи:

1) імунізація вакциною Паненза в/ч дозою 0,3 мл, наступна імунізація такою ж дозою через 14 днів;

2) імунізація вакциною МоноГриппол в/ч дозою 0,3 мл, наступна такою ж дозою через 14 днів;

3) введення в/ч води для ін'єкцій стерильної у дозі 0,3 мл на першу та 14-ту добу (контроль).

Половину дослідних тварин виводили з експерименту на 14-ту добу після імунізації шляхом декапітації під ефірним наркозом з отриманням сироватки крові, другу половину – на 30-ту добу, також отримуючи кров для дослідження сироватки. До кожної із зазначених груп тварин входило по 24 тварини.

Склад білків, що містять досліджувані вакцини, вивчали за допомогою біоаналізатора «Agilent-2100» («Dicosta Technologies», США), застосовуючи гель-електрофорез. Нуклеопротеїдний склад вакцин визначали за електрофореграмами, отримуючи дані про молекулярну масу білкових фрагментів, їх концентрацію та відсотковий вміст у досліджуваному препараті.

Про імуногенність вакцин робили висновок за реакцією гальмування гемаглютинації (РГГА) зі специфічним антигеном (у даному випадку – вірусом грипу, проти якого були сконструйовані вакцини, що вивчалися). Об'єктом дослідження була сироватка крові імунізованих вакцинами тварин, отримана у різні терміни після імунізації [3].

З метою видалення неспецифічних інгібіторів гемаглютинації, які можуть міститись у досліджуваних сироватках, перед здійсненням аналізу всі зразки оброблялися нейрамінідазою холерних вібріонів, що, впливаючи на специфічні антитіла, руйнує інгібітори гемаглютинації до вірусів А і В у сироватках людини і тварин [3].

Після видалення неспецифічних інгібіторів готували двократні розведення сироваток

у ямках плексигласового планшету, починаючи з 1:10 до 1:640 і вище у об'ємі 0,2 мл. До кожного розведення сироватки додавали 0,2 мл робочої дози антигену (4 АО). Суміш перемішували у шейкері при кімнатній температурі і залишали при $T = 20 \pm 2^\circ\text{C}$ на 30 хв, потім у кожну ямку додавали 0,4 мл 1 % суспензії курячих еритроцитів. Суміш повторно перемішували у шейкері, залишали при $T = 20 \pm 2^\circ\text{C}$ на 40–45 хв (до осідання еритроцитів у контролі), після чого проводили урахування результатів реакції. За наявності специфічних антитіл у сироватці спостерігалася затримка аглютинації еритроцитів. За титр сироватки брали граничне розведення, що викликало повну затримку гемаглютинації.

Затримка гемаглютинації вказує на відповідність типу антигену і взятої сироватки; відсутність затримки гемаглютинації свідчить про невідповідність типу взятої сироватки.

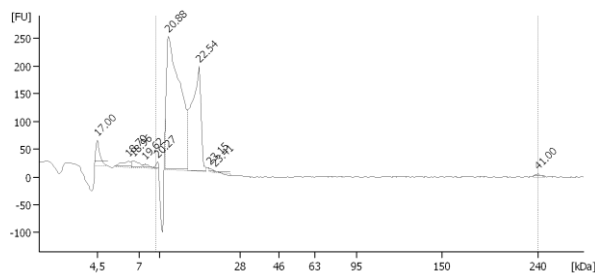


Рисунок 1. Молекулярний склад білків вакцини Паненза, визначений за електрофореграмою біоаналізатору «Agilent 2100»

Найвагоміші частки вірусних білків у досліджуваних вакцинах мали однакову кількість (по 2 на кожний препарат), проте були різними за своїми характеристиками та відсотковим вмістом у складі препарату. У вакцині Паненза превалювали білок з молекулярною вагою 16,4 кДа, кількість якого у препараті становила 80,19 мкг/мл (66,9 % всього білкового складу), та складова 21,4 кДа в об'ємі 38,47 мкг/мл (32,1 % загального білку). Вакцину МоноГриппол складала білок 32,0 кДа у кількості 46,12 мкг/мл (68,7 % від загальної кількості), а також білок 48,2 кДа у кількості 21,01 мкг/мл (31,3 %).

Відомо, що антигенна організація молекули ГА у вирішальному ступені обумовлює імунну відповідь. Різниця між типами вакцин по формі антигена полягає у тому, що у розщеплених вакцинах ГА прикріплений до фрагментів вірусної мембрани, а у субодичних вакцинах він присутній у вигляді окремих молекул. Ця різниця може чинити безпосередній вплив на ефективність імун-

ватки. Препарат враховують як специфічний, якщо він не реагує в РГГА з гетерологічною сироваткою.

Статистичну обробку даних проводили, використовуючи пакет прикладних програм Microsoft Excel – Statgraphics. Для виявлення значимих розбіжностей показників, що порівнювалися, використовували t-критерій Ст'юдента. Розбіжності вважали достовірними за рівня значущості $p < 0,05$. Дані наведено у вигляді середнього арифметичного значення M та середньоквадратичного відхилення σ .

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

В результаті проведених досліджень білкового складу вакцин було встановлено, що загальна кількість білку у субодичній вакцині МоноГриппол нижча, ніж у вакцині Паненза – 67,14 мкг/мл проти 119,86 мкг/мл (рис. 1, 2).

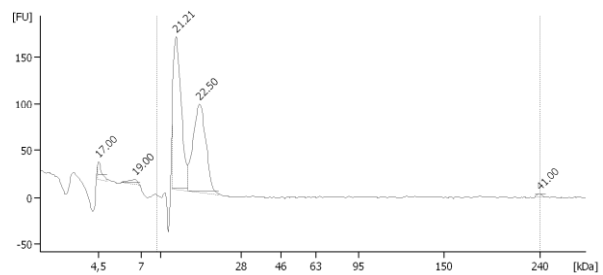


Рисунок 2. Молекулярний склад білків вакцини МоноГриппол, визначений за електрофореграмою біоаналізатору «Agilent 2100»

ної відповіді і братись до уваги за вакцинації різних груп населення. Якщо молекула ГА замкнена до ліпідної капсули (у випадку розщеплених вакцин), реакція В-лімфоцитів з виробки захисних антитіл, а також пам'ять В-лімфоцитів є більш високими, ніж у випадку очищених глікопротеїнових препаратів (субодичних вакцин).

В експериментах на мишах було також виявлено, що матриксні білки (М) та нуклеопротеїди (НП), що у мінімальних кількостях присутні у розщеплених вакцинах, відіграють важливу роль у стимуляції специфічних цитотоксичних Т-лімфоцитів та гуморальних імунних реакціях [2, 4]. Щодо останнього, у нашому дослідженні було виявлено, що вакцинний препарат Паненза містить додаткову кількість деяких білків (рис. 1) окрім головних складових. Так, у кількості 122,9 нг/мкл (0,6 % від загального складу) було визначено білок з молекулярною вагою 14,1 кДа, а також білки 23,2 кДа та 24,0 кДа, вміст яких у препараті становив 59,3 нг/мкл

(0,3 %) та 22,0 нг/мкл (0,1 %) відповідно.

Таким чином, кінцевим підсумком молекулярного дослідження білкового складу зазначених вакцин стало кількісне і якісне визначення їх складових – п'яти білкових компонентів препарату Паненза і двох – препарату МоноГриппол. Було встановлено, що загальний вміст білку у дослідженій субодиночній вакцині є нижчим, ніж у розщеплено-вірусній. Проте, всупереч розповсюдженій думці, це не свідчить про підвищений ступінь очистки субодиночної вакцини. Більш високий вміст білку у розщеплених вакцинах пояснюється присутністю екзогенних вірусних білків, таких, як М та НР, що слабо або зовсім не реєструються у субодиноч-

них вакцинах [5]. Виходячи з цього, особливо цікавим було дослідження найважливішої з характеристик вакцинних препаратів – імуногенного ефекту обраних протипандемічних вакцин. Критерієм імуногенності у наших випробуваннях став достатньо точний і такий, що широко застосовується для перевірки якості імунобіологічних препаратів, метод – реакція гальмування гемаглютинації. Враховуючи, що інактивовані вакцини стимулюють слабшу імунну відповідь у порівнянні, наприклад, з живими атенуйованими вакцинами [6, 7], ми застосовували двократне введення рівних доз досліджуваних препаратів (бустерну імунізацію). Результати цього дослідження подані у табл. 1.

Таблиця 1

Титри специфічних антитіл до вірусу А(Н1N1) за імунізації експериментальних тварин протипандемічними моновакцинами

Вакцинні препарати	Перша імунізація		Друга імунізація	
	Титр антитіл	Частка тварин, сироватка яких містила даний титр, %	Титр антитіл	Частка тварин, сироватка яких містила даний титр, %
Паненза	1 : 40	60	1 : 160	60
МоноГриппол	1 : 80	90	1 : 320	60
Контроль	1 : 10	95	1 : 10	90

Примітка: титри гальмування гемаглютинації по антигенам грипу у зазначеного відсотку тварин були не нижчими від наведених у таблиці.

Вакцина Паненза викликала приріст гомологічних антитіл у крові 60 % піддослідних тварин у 4 рази після першої імунізації та у 16 разів – у 60 % тварин після другої імунізації (табл. 1). Перша вакцинація препаратом МоноГриппол підвищувала титр гомологічних антитіл у 90 % щеплених тварин у 8 разів, друга вакцинація піднімала цей показник у 32 рази у 60 % особин, що були вакциновані.

Таким чином, МоноГриппол, що є рекомбінантним субодиночним вакцинним препаратом, який, за отриманими нами даними, складається з 2-х білкових складових практично у рівних частках і має менший загальний вміст білку, продемонстрував імуногенність, удвічі вищу, ніж розщеплено-вірусна вакцина Паненза, що нараховує 5 білкових складових. Очевидно, такий ефект субодиночної вакцини пояснюється застосуванням відомого давно випробуваного в Росії препарату Поліоксидоній (сополімер N-окису 1,4-етиленпіперазину та (N-карбокситил)-1,4-етиленпіперазинію броміду) у якості її ад'юванту [8, 9]. Проте, дані щодо імуногенності обох досліджених вакцин відповідають вимогам до вакцин типу А, а саме: викликати приріст гомологічних антитіл у крові у 4 та більше разів у не менш, ніж 60 % особин після двократного уведення [3, 10].

На завершення треба підкреслити, що не

зважаючи на виявлену імуногенність і білковий склад, ефективність проаналізованих вакцин, рівень захисту від клінічного захворювання, що ними забезпечується, частота і тяжкість небажаних побічних ефектів та епідеміологічна значущість їх молекулярних та біохімічних властивостей можуть бути оцінені тільки у клінічних випробуваннях.

ВИСНОВКИ

1. Вакцина МоноГриппол містить загальну кількість білку 67,14 мкг/мл і дві складових: 32,0 кДа у кількості 46,12 мкг/мл (68,7 % від загальної кількості), а також 48,2 кДа у кількості 21,02 мкг/мл (31,3 %).

2. Загальна кількість білку у препараті Паненза становить 119,86 мкг/мл, його складають п'ять білкових компонентів: 16,4 кДа, кількість якого у препараті становила 80,19 мкг/мл (66,9 % всього білкового складу); 21,4 кДа в об'ємі 38,47 мкг/мл (32,1 % загального білку); 14,1 кДа у кількості 122,9 нг/мкл (0,6 % від загального складу); 23,2 кДа у концентрації 59,3 нг/мкл (0,3%) та 24,0 кДа – 22,0 нг/мкл (0,1 %).

3. Імуногенність рекомбінантної субодиночної ад'ювантної протигрипозної моновакцини МоноГриппол є удвічі вищою порівняно з аналогічним показником вірусно-розщепленої безад'ювантної протигрипозної вакцини Паненза.

4. Імуногенність і вміст білкових компонентів обох досліджених вакцин проти вірусу грипу А(H1N1) відповідають вимогам до вакцин типу А.

ЛІТЕРАТУРА

1. Лавров В. Ф. Основы иммунологии, эпидемиологии и профилактики инфекционных болезней / В. Ф. Лавров, Е. В. Русакова, А. А. Шапошников [и др.] – М. : ЗАО «МП Гигиена», 2007. – 311 с.
2. Chaloupka I. Comparative analysis of six European influenza vaccines / I. Chaloupka, A. Schuler, M. Marschall, H. Meier-Ewert // Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. – 1996. – V. 15. – P. 121–127.
3. Бектимиров Т. А. Методы определения показателей качества иммунобиологических препаратов для профилактики и диагностики гриппа: Методические указания / Т. А. Бектимиров, Н. И. Лонская, Н. А. Агафонова [и др.] – М. : Федеральный центр Госсанэпиднадзора Минздрава России, 2003. – 32 с.
4. Xie H. Evaluating the vaccine potential of an influenza A viral hemagglutinin and matrix double insertion DNA plasmid / H. Xie, T. Liu, H. Chen [et al.] // Vaccine. – 2007. – V. 25, № 44. – P. 7649–7655.
5. Караулов А. В. Инфекции и иммунодефициты – приоритеты сегодня / А. В. Караулов // Практикующий врач. – 1997. – № 9. – С. 3–4.
6. Kunzel W. Kinetics of humoral antibody response to trivalent inactivated split influenza vaccine in subjects previously vaccinated or vaccinated for the first time / W. Kunzel, H. Glathe, H. Engelman, Ch. Van Hoecke // Vaccine. – 1996. – V. 14, № 12. – P. 1108–1110.
7. Laddy D. J. Immunogenicity of novel consensus-based DNA vaccines against avian influenza / D. J. Laddy, J. Yan, N. Corbitt [et al.] // Vaccine. – 2007. – V. 25, № 16. – P. 2984–2989.
8. Grebe K. M. Heterosubtypic immunity to influenza A virus: where do we stand? / K. M. Grebe, J. W. Yewdell, J. R. Bennink // Microbes and Infection. – 2008. – V. 10, № 9. – P. 1024–1029.
9. Ochiai H. Inactivated influenza vaccine effectiveness against influenza-like illness among young children in Japan – With special reference to minimizing outcome misclassification / H. Ochiai, M. Fujieda, S. Ohfuji [et al.] // Vaccine. – 2009. – V. 27, № 50. – P. 7031–7035.
10. Beran J. Evaluation of reactogenicity and immunogenicity of two influenza vaccines (vaxigrip and fluarix) in the season 1996–1997 / J. Beran, R. Prymula, R. Chilber [et al.] // Cent. Eur. J. Public Health. – 1998. – № 64. – P. 269–273.

УДК 576.851.47.095:612.118.221.39

НОВІ МЕТОДИЧНІ ПІДХОДИ ЩОДО ОЗНАЧЕННЯ ГЕМОЛІТИЧНОЇ ТА ЛЕЦИТИНАЗНОЇ АКТИВНОСТІ БАКТЕРІЙ РОДУ PROTEUS

Л. А. Юрченко

ДУ «Інститут мікробіології та імунології імені Мечникова» АМН України, Україна

Визначено гемолітичну та лецитіназну активність 80 штамів бактерій роду *Proteus*, виділених з різних осередків інфекції; штами протею, виділені з патологічного матеріалу, проявили вірогідно вищу гемолітичну та лецитіназну активність у порівнянні зі штамами, вилученими від носіїв. Розроблено цільне живильне середовище із пригнічуючими роїння властивостями, яке суттєво не впливало на здатність протею до гемолізу еритроцитів та прояву лецитіназної активності. Залежності ступеню гемолітичної або лецитіназної активності бактерій роду *Proteus* від форми дисоціації не виявлено.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: гемолізін, лецитіназа, Н-, О-форми дисоціації, роїння

НОВЫЕ МЕТОДИЧЕСКИЕ ПОДХОДЫ К ОПРЕДЕЛЕНИЮ ГЕМОЛИТИЧЕСКОЙ И ЛЕЦИТИНАЗНОЙ АКТИВНОСТИ БАКТЕРИЙ РОДА PROTEUS

Л. А. Юрченко

ГУ «Институт микробиологии и иммунологии имени Мечникова» АМН Украины, Украина

Определена гемолитическая и лецитиназная активность 80 штаммов бактерий рода *Proteus*, выделенных из различных очагов инфекции; штаммы протея, изолированные из патологического материала, проявили более выраженную гемолитическую и лецитиназную активность по сравнению со штаммами, выделенными от здоровых носителей. Разработана плотная питательная среда с