

УДК 616.9-036.2

**БІОЛОГІЧНА ХАРАКТЕРИСТИКА АНТИГЕНІВ  
ЗБУДНИКА ДИФТЕРІЇ, ВИДІЛЕНИХ ЗА ДОПО-  
МОГОЮ ФІЗИКО-ХІМІЧНИХ МЕТОДІВ**

**Єлісєєва І.В., Бабич Є.М., Ждамарова Л.А.,  
Білозерський В.І., Горбач Т.В., Колпак С.А.,  
Бобирєва І.В.**

**Державна установа «Інститут мікробіології та іму-  
нології ім. І.І.Мечникова АМН України»  
Харківський медичний університет**

Нові антигенні субстанції були й залишаються основою для удосконалення вакцинних і діагностичних препаратів. Антигенні фракції дифтерійних бактерій численні (понад 25 антигенних компонентів) й відрізняються за своїми імунохімічними властивостями [1-15]. Чистий препарат клітинних стінок збудника дифтерії одержували на основі ультразвукової дезінтеграції мікробної маси, подальшого ультрацентрифугування, діалізу та ліофілізації [1, 13-15]. Взагалі, історія одержання антигенних фракцій з мікроорганізмів і, зокрема, коринебактерій, налічує багато різноманітних методів, серед яких - екстракція гідроксиламіну гідрохлоридом [8, 12], сольова екстракція в лужному середовищі [9], екстракція дезоксихолатом натрію [10], ацетоном і ефіром в сполученні з заморожуванням і відтаванням [11], який інактивує бактеріальну клітину, не руйнуючи її [12], та інші [5].

Однією з сучасних тенденцій розвитку науки з проблем удосконалення вакцинних препаратів проти патогенних бактерій є заміна хімічних методів одержання антигенів з протективними та ад'ювантними властивостями на фізичні, при застосуванні яких легше досягти стандартних умов дезінтеграції мікробних клітин, відпадає необхідність в проведенні коштозатратних операцій по очищенню виділених антигенів від хімічних реагентів, а також відкриваються перспективи налагодження випуску нативних, хімічно не змінених, а значить більш специфічних, вакцинних препаратів. При цьому пропонується застосування ультразвукової дезінтеграції, молекулярних сит, бактеріологічних та імунологічних методів. Активно вивчаються методи ультразвукової інактивації мікробів за допомогою озвучення під тиском при різних температурних режимах. Розроблені й комбіновані способи дезінтеграції бактерій, які поєднують фізичні та хімічні методи [16, 17]. Проте, дослідникам не вдалося повністю вирішити питання одержання антигенів зі стабільними хімічними структурами.

Щодо протидифтерійних вакцин, то сучасні специфічні профілактичні препарати представлені дифтерійним анатоксином у складі різних багатокомпонентних вакцин [18].

Проте відомо, що антитоксичний імунітет не перешкоджає носійству токсигенних коринебактерій дифтерії, їх інвазії та перебуванню в організмі людини. Антибактеріальний імунітет є фактором, що локалізує дифтерійну інфекцію в організмі. Він характеризується клітинно-опосередкованими механізмами та гіперчутливістю уповільненого типу. На фоні зниженого анти-

бактеріального протидифтерійного імунітету формується носійство токсигенних коринебактерій дифтерії. Ефективні методи лікування стійкого бактеріоносійства відсутні. Збереження резервуару інфекції в сучасному соціумі, в тому числі й в Україні [19-22], про що свідчить епідемія дифтерії в країнах Східної Європи в останньому десятиріччі минулого століття, диктує необхідність подальшого вивчення можливостей запобігання бактеріоносійству коринебактерій дифтерії шляхом утворення достатнього рівня антибактеріального імунітету.

Експериментальні дослідження, проведені в МНДІЕМ ім. Г.М. Габричевського, обґрунтували необхідність пошуку бактеріальних антигенів, відповідальних за формування резистентності організму до інвазії збудника [6]. Дослідниками був запропонований препарат «Дифтерійна бактеріальна вакцина рідка», яка являє собою суспензію основного компоненту клітинних стінок штаму коринебактерій дифтерії – речовини пептидо-ліпополісахаридної природи. Препарат був одержаний шляхом ультразвукової дезінтеграції й подальшого диференціального центрифугування. Складається з пептидоглікану, полісахариду, ліпідів, білків. Із клітинних стінок коринебактерій дифтерії авторами був одержаний біологічно активний білок з молекулярною масою 64 кДа, який мав високу антигенну активність в реакції непрямой радіоімуноадсорбції з сироваткою людини, що містить протидифтерійні антитіла [7].

Відомо, що хімічний склад клітинної стінки *C. diphtheriae* являє собою складний конгломерат речовин різної природи [1, 2]. Основну частину клітинної стінки складає комплекс полісахариду з пептидами тієї чи іншої довжини, який одержав назву ригідного каркасу або «базального шару», R-шару, мукопептиду (пептидоглікану). До хімічного складу мукопептиду входять: N-ацетилглюкозамін, N-ацетилмурамова кислота та амінокислоти. Він відповідає за підтримку форми клітини та її міцність. У грампозитивних бактеріях він займає понад 50 % речовини клітинних стінок і є носієм декількох детермінант, здатний стимулювати неспецифічну стійкість до бактеріальних інфекцій, фагоцитоз, володіє ад'ювантною активністю – підвищує імунітетність антигену, може викликати запалення та виявляти пірогенну дію, пептидогліканові антитіла можуть нейтралізувати токсичну дію клітинних стінок та мають перехресну реакцію серед грампозитивних видів мікроорганізмів [23, 24]. Білки організму людини, що розпізнають пептидоглікани, є бактерицидними до патогенних та непатогенних грампозитивних бактерій. Подібно до глікопептидних антибіотиків (наприклад, ванкоміцину), ці білки вбивають бактерії шляхом прямої взаємодії з пептидогліканом клітинних стінок [25].

До мукопептиду приєднуються полісахаридні та ліпідні компоненти клітинної стінки за допомогою глюкозидних і ефірних зв'язків. Мурамова кислота і арабіногалактан у вигляді довгих

ланцюжків через ефірні зв'язки з'єднуються з гідроксильованими жирними кислотами.

Арабіногалактан у комплексі з діамінопіміліновою кислотою та набором цукрів відповідає за родові властивості та є О-антигеном. За даними електрономікроскопічного аналізу, зовнішній шар мікробної клітини збудника дифтерії німічно прилягає до стінки й легко видаляється слабким промиванням або м'яким екстрагуванням. Він складається з ліпідів, зв'язаних з поверхневими протеїнами і полісахаридами. Ліпідні антигени поверхні клітини до певної міри визначають інвазивні та некротичні властивості дифтерійного мікробу. У комплексі з лабільними поверхневими протеїнами (К-антигенами) вони є одним з факторів вірулентності. К-антиген відповідальний також за типові властивості [2].

Антигенні препарати, виготовлені з мікробної маси збудника, звільнену від екзотоксину, мають антигенну та імуногенну активність, що виявляється в антибактеріальній, гуморальній та клітинній відповіді макроорганізму при імунізації бактеріальним компонентом збудника.

Бактеріальний компонент збудника дифтерії має самостійне значення в імуногенезі, яке доведено у різні способи, наприклад, імунізація тварин призводить до вираженої лімфоплазматичної реакції у внутрішніх органах імунізованих кролів [3]. Антимікробні IgG- і IgM-антитела відіграють протективну роль в протидифтерійному імунітеті. Протидифтерійні сироватки, позбавлені IgG- антимікробних антитіл, мали меншу протективну активність, аніж сироватки, які містили IgG- та IgM-антимікробні й IgG-антитоксичні антитіла [4]. Імунізація морських свинок солянокислою фракцією дезоксихолатного екстракту збудника дифтерії, що мала білковий характер, викликала в них стійкість до зараження живою вірулентною культурою *S.diphtheriae* при відсутності в крові слідів антитоксину [5].

Порівняльна біологічна та імунохімічна характеристика основних антигенних препаратів, виготовлених в різні способи з дифтерійних мікробів, свідчить про певні відмінності в їх токсичності, реактогенності, антигенних та імуногенних властивостях [2].

Проведені нами дослідження спрямовані на розробку підходів до удосконалення вакцинних препаратів проти дифтерії. Зокрема передбачалась розробка методів одержання антигенів, більш дешевих порівняно з хімічними технологіями; очікувалось визначити оптимальні параметри фізичних факторів для одержання зразків препаратів антигенних фракцій *S. diphtheriae*. Отже за мету запроваджуваного дослідження було поставлено розробити фізичні технології

одержання нативних антигенів *S.diphtheriae*, ідентичних відповідним клітинним структурам патогенів по хімічній структурі, молекулярній вазі, імуногенним та ад'ювантним властивостям.

### Матеріал і методи досліджень

На першому етапі досліджень проводилося накопичення мікробної маси *Corynebacterium diphtheriae* var. *gravis* токсигенний виробничий штаб *massachusetts*, наданий Харківським ЗАТ «Біолек».

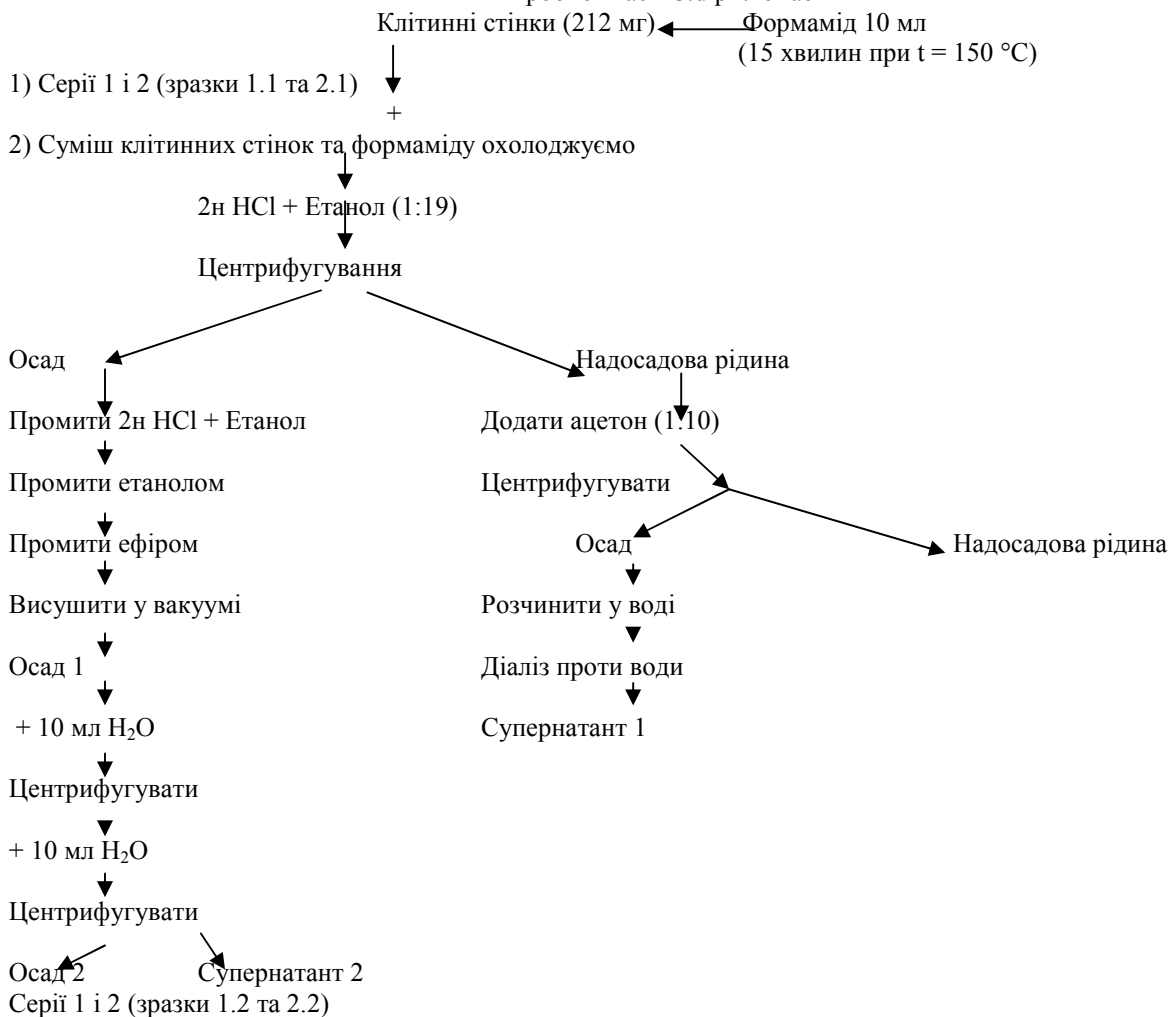
Одержання препаратів антигенних фракцій коринебактерій дифтерії відбувалося у різних режимах, які передбачали промивання мікробної маси фізіологічним розчином, інактивацію та обробку мікробних клітин 20 %-им стерильним розчином натрію хлориду, ультразвуком низької та середньої частоти (лабораторні прилади УЗДН-2Т та ТУ 3468-001-42369179-03) від 5 хвилин до 1-7 годин, ультрафільтрацію дезінтегратів через міліпорові фільтри «Владіпор» № 1 та № 4. Оптичну щільність досліджуваних речовин визначали за допомогою приладу *Densi-la-meter* за шкалою *McFarland*. Досліджувані речовини перевіряли на відсутність росту коринебактерій, висіваючи на 5 % кров'яний агар.

Було виготовлено п'ять серій мікробних дезінтегратів, дві серії супернатантів та дві серії клітинних стінок *S. diphtheriae*. Супернатанти відокремлювались від мікробної маси після півгодинного центрифугування суспензії мікробних клітин при 6 тис. об./хв. (2600 g). Супернатанти піддавали діалізу впродовж доби проти дистильованої води; концентрування дезінтегратів та супернатантів проводили за допомогою випарювання; висушування препаратів клітинних стінок здійснювали в анаеростаті над сіллю кальцію хлориду впродовж п'яти діб.

На другому етапі вивчалася характеристика одержаних зразків препаратів антигенних фракцій *S. diphtheriae* за їх хімічною структурою, молекулярною масою та відбір експериментальних зразків препаратів субклітинних комплексів для подальшого вивчення їх антигенних та ад'ювантних властивостей.

Біохімічні дослідження здійснювалися на базі кафедри біохімії Харківського медичного університету за даними хроматографічного аналізу. На рисунку 1 представлена відповідна схема проведення біохімічного дослідження різних антигенних препаратів, виготовлених з мікробних клітин *S.diphtheriae*.

Схема проведення біохімічного дослідження сольових екстрактів ультразвукових дезінтегратів (супернатантів серії 1 і 2) та клітинних стінок, виготовлених з мікробної маси *C.diphtheriae*



Кількісну оцінку вмісту білку в досліджуваних антигенних препаратах проводили за допомогою спектрофотометрії (спектрофотометр СФ-56 «Ломоспектр»). Білки антигенних фракцій досліджуваних препаратів характеризували за молекулярною масою та гомогенністю методом електрофорезу за допомогою біоаналізатору Agilent 2100.

Одержані антигенні препарати перевіряли на вміст дифтерійного токсину за допомогою реакції флокуляції зі специфічною антитоксичною дифтерійною сироваткою.

#### РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ І ОБГОВОРЕННЯ

Визначення концентрації білку за допомогою спектрофотометрії у дослідних зразках мікробних дезінтегратів суспензії *C.diphtheriae*, виготовлених за різних умов обробки, показало результати, представлені у таблиці 1. В режимах обробки мікробних клітин низькочастотним ультразвуком впродовж 5-20 хвилин та 3 годин, який передбачав суспендування мікробної маси на фізіологічному розчині (серія I, протокол № 1 від 26.02.08), вміст білку після дезінтеграції склав  $(0,85 \pm 0,4)$  мг/мл (табл. 1).

Зразки серії II (протокол № 4 від 3.03.08) містили в середньому  $(1,4 \pm 0,2)$  мг/мл білку. Виготовлення мікробної суспензії відрізнялася від попередньої інактивацією її до ультразвукової обробки та застосуванням ультразвуку середньої частоти. Також концентрацію вихідної суспензії було збільшено в 4 рази.

У семи зразках мікробних дезінтегратів *C.diphtheriae* серії II а, (протокол № 5 від 06.03.08), виготовлених у режимі, який передбачав початкове виготовлення мікробної суспензії на 20 %-ому розчині натрію хлориду, витримання її в холодильнику при температурі  $8^{\circ}\text{C}$  впродовж 18 годин, триразове промивання мікробних клітин фізіологічним розчином та подальшу обробку ультразвуком середньої частоти від однієї до семи годин, загальний вміст білку становив  $(0,93 \pm 0,02)$  мг/мл.

Тривалість ультразвукової обробки як у низькочастотному (від 5 хвилин до 3 годин), так і в середньочастотному діапазоні (від 1 до 7 годин) ультразвукового опромінення істотно не впливала на показник концентрації білку в досліджуваних зразках антигенних препаратів ( $t > 2$ ) і визначалась в певній мірі вихідною оптичною щільністю мікробної суспензії. Проте через три години опромінення ультра-

звуком в серіях II і III а концентрація білку дещо знизилась у порівнянні з вихідною суспензією; в серіях I і III майже не змінилась, а в серії IV – підвищилась.

При виготовленні наступних серій ми виходили з умов застосування 20 %-го розчину натрію хлориду та 3-годинної тривалості опромінення ультразвуком середньої частоти.

Серію III одержували з урахуванням наступних відмінностей: мікробну масу спершу триразово промивали стерильним фізіологічним розчином, а потім її ресуспендували 20 %-им розчином натрію хлориду і 3 години витримували при кімнатній температурі. Інактивацию мікробних клітин проводили в інактиваторі впродовж 1 години при 56 °C після ультразвукової обробки. В результаті середній показник концентрації білку дорівнював (2,4 ± 0,2) мг/мл.

**Таблиця 1 – Порівняльний аналіз концентрації білку (мг/мл) в різних серіях мікробних дезінтегратів суспензії *C.diphtheriae***

| Досліджувані речовини                       | Серія I (протокол № 1)               | Серія II (протокол № 4) | Серія III (протокол № 5) | Серія III (протокол № 7) | Серія IV (протокол № 8) |
|---|--------------------------------------|-------------------------|--------------------------|--------------------------|-------------------------|
| Вихідна суспензія                           | 0,6                                  | 2,3910                  | 1,847                    | 2,2848                   | 4,5608                  |
| Через 1 годину ультразвукової обробки       | 5 хвилин – 0,56<br>10 хвилин – 0,54  | 1,5223                  | 0,9268                   | 2,3458                   | 4,6343                  |
| Через 2 години ультразвукової обробки       | 15 хвилин – 2,05<br>20 хвилин – 0,59 | 1,3378                  | 0,8948                   | 2,4705                   | 4,9375                  |
| Через 3 години ультразвукової обробки       | 0,52                                 | 1,3735                  | 0,9208                   | 2,3050                   | 6,3773                  |
| Середня концентрація білку у зразках, мг/мл | 0,85 ± 0,4                           | 1,4 ± 0,2               | 0,93 ± 0,02              | 2,4 ± 0,2                | 5,3 ± 1,3               |

(M ± m)

Отже динаміка збільшення концентрації білку спостерігалась лише при виготовленні IV серії антигенних препаратів.

В таблиці 2 наданий порівняльний аналіз одержаних результатів спектрофотометрії одержаних

**Таблиця 2 – Результати визначення концентрації білку у дослідних зразках супернатантів мікробних дезінтегратів суспензії *C.diphtheriae*, виготовлених за різних умов обробки ультразвуком середньої частоти та гіперосмотичним шоком**

| Досліджувані препарати  | Концентрація білку, мг/мл |
|---|---------------------------|
| Контроль 1 (фізіологічний розчин)   | 0,0754                    |
| Контроль 2 (фізіологічний розчин)   | 0,0750                    |
| Контроль 3 (дифтерійний токсин)   | 11,5908                   |
| I - Супернатант серія 1* (після діалізу та випарювання, протокол № 7 від 18.03.08)      | 0,8160                    |
| II - Супернатант серія 1* (після діалізу та без випарювання, протокол № 7 від 18.03.08) | 0,7620                    |
| III - Супернатант серія 2** (після діалізу та випарювання, протокол № 8 від 26.03.08)   | 0,5600                    |
| IV - Супернатант серія 2' (без діалізу та випарювання, протокол № 8 від 26.03.08)       | 0,6364                    |

У результаті процесів діалізу та випарювання досліджуваних препаратів концентрація білку у супернатантах істотно не змінилась.

Результати реакції флокуляції були негативними, тобто дифтерійний токсин за допомогою цієї методики в досліджуваних антигенних препаратах дезінтегратів коринебактерій дифтерії не знайдено.

При виготовленні серії IV мікробні клітини спершу інактивували в тому ж режимі, а потім тричі відмивали фізіологічним розчином та витримували мікробну суспензію, виготовлену на 20 %-му сольовому розчині, 3 години у холодильнику при 4 °C, знову відмивали фізіологічним розчином з подальшою ультразвуковою обробкою у середньому діапазоні частот. У зразках цієї серії середній показник концентрації білку дорівнював (5,3 ± 1,3) мг/мл. В таблиці 1 наданий порівняльний аналіз одержаних результатів спектрофотометрії одержаних зразків антигенних препаратів мікробних дезінтегратів різних серій.

зразків антигенних препаратів супернатантів серій I і 2. Суттєвої різниці в концентрації білку в досліджуваних зразках обох серій не виявлено.

Результати біохімічного дослідження одержаних антигенних препаратів коринебактерій дифтерії, представлені у таблиці 3, показали, що супернатанти обох серій містять у собі у великій кількості основні складові мукопептиду клітинних стінок – ацетилмурамову кислоту та N-ацетилглюкозамін. З амінокислот у зразках I і III суттєво більшою є питома вага лізину – (63,6 ± 1,6) % і (46,1 ± 1,9) %, відповідно, який є продуктом руйнування діамінопіме-

лінової кислоти, аланіну – (24,5 ± 2,4) % і (27,1 ± 2,2) %, відповідно, та глютамінової кислоти – (27,2 ± 2,4) % і (17,5 ± 2,3) %, відповідно. На порядок меншою є кількість серину, аспарагінової кислоти, аргініну та гістидину.

Препарати клітинних стінок обох серій після початкової обробки гарячим формамідом містили велику кількість глютамінової кислоти (578,6 і 613,0 нМоль/мл, відповідно) та аміноцукрів – складових мукопептиду – ацетилмурамової кислоти та N-

ацетилглюкозаміну. При додаванні суміші 2н НСІ + етанол (1:19) і після подальшої обробки виявилася велика кількість аланіну (205,8 і 277,6 нМоль/мл, відповідно) та гліцин. Ці дані в основному збігаються із даними літератури [1, 9]. Але в наших дослідженнях у гідролізатах клітинних стінок не знайдено галактозаміну, що можна пояснити наслідком процесу гідролізу з утворенням лізину.

**Таблиця 3 – Результати біохімічного дослідження антигенних препаратів мікробних дезінтегратів та клітинних стінок, виготовлених з мікробної маси *C.diphtheriae***

| Біохімічні складові,<br>нМоль/мл | Супернатанти   |                  | Клітинні стінки                                |       |   |       |
|----------------------------------|----------------|------------------|--|-------|---|-------|
|                                  | Серія 1<br>(I) | Серія 2<br>(III) | Серія 1 і 2<br>(після обробки форма-<br>мідом) |       | Серія 1 і 2<br>(після подальшої обро-<br>бки) |       |
|                                  |                |                  | 1.1  | 2.1   | 1.2   | 2.2   |
| Ацетилмурамова кислота           | 242,6          | 205,7            | 265,8  | 280,3 | 105,8   | 142,6 |
| N-ацетилглюкозамін               | 545            | 528,6            | 385,7  | 400,2 | 202,3   | 184,2 |
| Глутамінова кислота              | 345            | 271,8            | 578,6  | 613,0 | 89,5  | 100,0 |
| Лізін                            | 805,7          | 716,8            | -  | -     | -   | -     |
| Аланін                           | 310,75         | 421,25           | 1,22   | 1,43  | 205,81  | 277,6 |
| Гліцин                           | 2,02           | 1,95             | 2,86   | 3,0   | 10,15   | 8,43  |
| Серин                            | 55,8           | 47,6             | -  | -     | -   | -     |
| Аспарагінова кислота             | 30,5           | 23,7             | -  | -     | -   | -     |
| Треонін                          | 6,5            | 8,0              | -  | -     | -   | -     |
| Валін                            | 7,3            | 9,2              | -  | -     | -   | -     |
| Ізолейцин                        | 5,9            | 9,6              | -  | -     | -   | -     |
| Лейцин                           | 7,6            | 8,0              | -  | -     | -   | -     |
| Аргінін                          | 12,9           | 27,6             | -  | -     | -   | -     |
| Гістидин                         | 19,6           | 7,9              | -  | -     | -   | -     |
| Фосфати                          | 1,926          | 1,284            | -  | -     | -   | -     |

У складі цукрів у гідролізатах клітинних стінок та мукопептиду досліджуваних препаратів було знайдено арабінозу, рамнозу, галактозу, глюкозу, манозу.

При електрофоретичному розділенні солюбілізованих білків 12 досліджуваних антигенних препаратів коринебактерій дифтерії було виявлено від 5 до 28 фракцій з молекулярною вагою від 21 до 48 кДа. В тому числі у препаратах №№ 3, 6, 7, 8, 9, 10 домінували фракції з молекулярною масою 48 кДа, що у кількісному відношенні характеризувалось, відповідно, наступними показниками: 152,6, 146,7, 160, 276,5, 135,7 і 150 FU.

### Висновки

Хімічний склад досліджуваних антигенних препаратів відповідає переліку компонентів, виявлених за даними літератури для аналогічних речовин. Препарат клітинних стінок, одержаний методом поєднання гіперосмотичного шоку та дезінтеграції мікробних клітин ультразвуком, містить в собі ригідний мукопептидний каркас і полісахаридні комплекси

розчинних та нерозчинних антигенів. Мукопептид із дифтерійних бактерій, що був витягнутий з клітинних стінок за допомогою гарячого формаміду, є за хімічним складом простим пептидополісахаридним комплексом. Препарати розчинних антигенів (супернатанти) принципово не відрізнялись за хімічним складом від дезінтеграту мікробної маси збудника дифтерії.

За результатами електрофоретичного дослідження білкових фракцій одержаних зразків для подальшого вивчення їх ад'ювантної, антигенної активності та впливу на неспецифічний імунітет були відібрані препарати з високим вмістом високомолекулярних білкових фракцій (переважно 48 кДа), а також дві серії препаратів клітинних стінок *C.diphtheriae*.

### Список літератури

1. Шмелева Е.А., Биргер М.О. Получение препаратов клеточных стенок *C.diphtheriae* и определение их антигенного состава // Журн. микробиол., 1971.- № 4.- С.73-78.

2. Шмелева Е.А., Мазурова И.К., Бочкова В.А. Сравнительная характеристика некоторых антигенных фракций дифтерийного микроба // ЖМЭИ. - 1974.-№ 4.-С.31-35.
3. Бочкова В.А., Владимирцева А.Л. Морфологические изменения в органах животных, иммунизированных бактериальным компонентом *C.diphtheriae* // Сб. науч. тр. МНИИЭИМ «Острые детские инфекции», 1978.-Т.19.-С.23-26.
4. Мазурова И.К.. Роль противомикробных антител в пассивной защите организма от дифтерийной инфекции //Сб. науч. тр. МНИИЭИМ «Острые детские инфекции», 1978.-Т.19.-С.26-34.
5. Бюргер М.О., Гренкова Е.П. Определение напряженности антимикробного противодифтерийного иммунитета в остром опыте // Сб. науч. тр. МНИИЭИМ «Острые детские инфекции», 1978.-Т.19.-С.34-39.
6. Шмелева Е.А., Микитин Д.П., Кузиков А.Н. и соавт. Характеристика дифтерийной бактериальной вакцины и результаты ее исследования в эксперименте и на людях // Тез. докл. V Всерос. съезда микробиол. и эпидемиол. – М., 1985.-С.69-71.
7. Кондрашина Н.Н., Шмелева Е.А., Берестень С.Ф. Выделение и иммунохимическая характеристика растворимых мембранных белков клеточных стенок коринебактерий дифтерии //Биохимия, 1987.-Т. 52. вып. 6.-С. 978-983.
8. Калягина С.Ю., Икрамов А.А. Биотехнология получения дифтерийной преципитирующей сыворотки //Анналы Мечниковского Института, 2006.- N 3 (www.imiamn.org/jorn).
9. Костюкова Н.Н., Кадырова Х.В., Езепчук Ю.В. Серологическое исследование соматического компонента, выделенного из *C. diphtheriae* // Журн. микробиол. – 1970. – № 4. – С. 559- 564.
10. Биргер М. О., Гренкова Е. П., Фиш Н. Г. и соавт. Защитный соматический антиген *Corynebacterium diphtheriae* //Журн. микробиол. – 1980. – № 1. – С. 46-48.
11. Филиппова Л. М., Холчев Н. В., Мазурова И. К. Фракционный состав экстрактов коринебактерий дифтерии по данным ионообменной хроматографии и гель - фильтрации //Проблемы эпидемиологии и клиники инфекционных болезней. – М., 1979. – Т.ХХI. – С.118-122.
12. Захарова Н.Е. Определение влияния гидроксилamina гидрохлорида на состав и свойства антигенов *Shigella dysenteriae*. Автореф. дисс. ..., канд. мед. наук М., 2001. – 19с.
13. Высоккий В.В. К вопросу о строении поверхностных структур коринебактерий // Журн. микробиол. – 1976. – № 7. – С. 112-119.
14. Шмелёва Е.А., Кузиков А.Н., Сухорукова Н.Л. Титры антител к антигенам клеточных стенок коринебактерий дифтерии у различных групп детей //Эпидемиология, микробиология и профилактика капельных инфекций: Сб.науч. тр. МНИИЭИМ. – М., 1983. – С.50-56.
15. Шмелева Е.А., Кондрашина Н.Н., Батурина И.Г.. Иммуномодулирующие свойства антигенов клеточных стенок нетоксигенных коринебактерий дифтерии //Антибиотики и химиотерапия, 1988.-т.ХХХIII.- № 8.- С.601-605.
16. Patent 2000060549 (JP) МПК C12N1/06; C12N1/20; C12N13/00; C12N1/06; C12N1/20; C12N13/00. Cell disruption method using sonification. Llorin O.J; Little M.C; Collins M.P. et. al Published 2000-02-29.
17. Патент № 2248217 (RU) МПК A61K39/02 C 12 P 21/00. Способ получения иммуногенного препарата из *Yersinia pestis* EV. /Иркутский научно-исследовательский противочумный институт, Николаев Б.В., Иванова Т.А., Половинкина В.С. и др. – 3. № 2003115185/13; Заявл. 22.05.2003; Опубл. 20.03.2005.
18. Учайкин В.Ф., Шамшева О.В.. Вакцинопрофилактика. Настоящее и будущее. М.: Гэотар-мед, 2001.-400с.
19. Чудная Л.М., Оксюк В.Г., Красюк Л.С. и соавт. Эпидемиологическая ситуация по дифтерии на Украине //Журн. эпидемиол., 1999.-№ 1.-С.10-12.
20. Kolodkina V., Titov L, Sharapa T. et. al. Molecular epidemiology of *C. diphtheriae* strains during different phases of the diphtheria epidemic in Belarus // BMC Infect Dis., 2006.- v. 6.-P. 129-137.
21. Костюкова Н.Н. Уроки дифтерии //Журн. микробиол., 1999.-№ 2.-С.92-96.
22. Mattos-Guaraldi AL, Moreira LO, Damasco PV, Hirata Júnior R. Diphtheria remains a threat to health in the developing world – an overview // Mem Inst Oswaldo Cruz., 2003.- v. 98.-P. 987–989.
23. Франклин Т., Сноу Дж. Биохимия антимикробного действия. Пер. с англ. М., 1984.
24. Verbrugh HA, Verhoef J, Wilkinson BJ. et. al. Biology and clinical significance of peptidoglycan antibody response in staphylococcal infections // Scand J Infect Dis Suppl. 1983;41:117-25.
25. Cho S., Wang Qian, Swaminathan Chittoor P., Structural insights into the bactericidal mechanism of human peptidoglycan recognition proteins //Biochemistry, 2007.- May 22; 104(21): 8761–8766.

**УДК 616.9-036.2**

**БІОЛОГІЧНА ХАРАКТЕРИСТИКА АНТИГЕНІВ ЗБУДНИКА ДИФТЕРІЇ, ВИДІЛЕНИХ ЗА ДОПОМОГОЮ ФІЗИКО-ХІМІЧНИХ МЕТОДІВ  
Єлисєєва І.В., Бабич Є.М., Ждамарова Л.А., Білозерський В.І., Горбач Т.В., Колпак С.А., Бобирєва І.В.**

Проведені дослідження присвячені розробці підходів до удосконалення вакцинних препаратів проти дифтерії, а саме: спрямованих на підвищення протибактеріального імунітету як фактору локалізації дифтерійної інфекції в організмі. Для одержання нативних антигенів збудника дифтерії застосовувалися фізико-хімічні чинники. На першому етапі досліджень був визначений найбільш перспективний режим ультразвукової дезінтеграції мікробних клітин *C. diphtheriae*, використання хімічних речовин, ультрафільтрації для одержання антигенних препаратів, що потен-

ційно можуть мати ефективні імуногенні та ад'ювантні властивості. Дана характеристика одержаних зразків препаратів антигенних фракцій *C. diphtheriae* за їх хімічною структурою та молекулярною масою.

**Ключові слова:** дифтерія, вакцина, ультразвук

**УДК 616.9-036.2**

**БИОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА АНТИГЕНОВ ВОЗБУДИТЕЛЯ ДИФТЕРИИ, ВЫДЕЛЕННЫХ С ПОМОЩЬЮ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ МЕТОДОВ**

**Елисеєва І.В., Баби́ч Е.М., Ждамарова Л.А., Белозерский В.И., Горбач Т.В., Колпак С.А., Бобырева И.В.**

Проведенные исследования посвящены разработке подходов к усовершенствованию вакцинных препаратов против дифтерии, а именно: направлены на повышение антибактериального иммунитета как фактора локализации дифтерийной инфекции в организме. Для получения нативных антигенов возбудителя дифтерии использовались физико-химические факторы. На первом этапе исследований был определен наиболее перспективный режим ультразвуковой дезинтеграции микробных клеток *C. diphtheriae*, использования химических веществ, ультрафильтрации для получения антигенных препаратов, которые потенциально могут обладать эффективными иммуногенными и адъювантными свойствами. Дана характеристика полученных образцов препаратов антигенных фракций по химической структуре и молекулярному весу.

**Ключевые слова:** дифтерия, вакцины, ультразвук

**UDC 616.9-036.2**

**BIOLOGICAL CHARACTERISTICS OF DIPH-  
THERIAE PATHOGEN ANTIGENS OBTAINED  
BY PHYSICOCHEMICAL METHODS**

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

Conducted study covers development of approaches to diphtheria vaccine improvement notably referred to increase of antibacterial immunity as a factor of diphtheria infection localization in a humane organism. Physico-chemical factors are used for obtaining of native pathogen antigens. At the first stage of the study the most perspective regime of the microbe cells ultrasonic disintegration, use of chemical agents and ultra filtration are taken for antigen preparations obtaining with the potentially most effective immunogenic and adjuvant properties. A description of the obtained specimens of antigenic fractions preparations on chemical composition and molecular weight is represented.

**Keywords:** diphtheria, vaccine, ultrasonic