

УДК 615.317:616:619:661.164.2

**Богданов Н.В., Хайруллин Б.М., Касенов М.М., Волгин Е.Н., Нурпейсова А.С.,
Сарсенбаева Г.Ж., Исагулов Т.Е. Сагымбай А.Б., Абитай Р.Т.**

*Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности
(НИИПББ) КН МОН РК, пгт. Гвардейский*

ИЗУЧЕНИЕ АЛЛЕРГЕННОСТИ ВЕКТОРНОЙ ВАКЦИНЫ TB/FLU-04L ДЛЯ ПРОФИЛАКТИКИ ТУБЕРКУЛЕЗА У ЛЮДЕЙ

Аннотация

В работе представлены результаты доклинических исследований изучения аллергенности векторной вакцины TB/FLU-04L для профилактики туберкулеза у людей, разработанной в НИИПББ. В результате изучения аллергенности в реакциях гиперчувствительности немедленного и замедленного типов установлено, что вакцина не обладает аллергенными свойствами.

Ключевые слова: туберкулез, вакцина, профилактика, аллергенность.

Введение

Туберкулез является инфекционной бактериальной болезнью, вызываемой микобактерией туберкулеза, которая наиболее часто поражает легкие. Туберкулез передается от человека человеку через капли из глотки и легких людей, больных активной респираторной формой болезни. Чаще всего после инфицирования микобактериями заболевание протекает в бессимптомной, скрытой форме (тубинфицированность), но примерно один из десяти случаев скрытой инфекции переходит в активную форму [1].

В 2010 году Республика Казахстан занимала одно из лидирующих положений среди стран **СНГ и Европы, в стране** количество зарегистрированных случаев туберкулеза превышало эпидемиологический показатель в **2-3 раза** по уровню заболеваемости туберкулезом [2].

По данным ВОЗ, в 2014 году 9,6 миллиона человек заболели туберкулезом и 1,5 миллиона человек умерли от этой болезни. Более 95 случаев смерти от туберкулеза происходит в странах с низким и средним уровнем дохода, и эта болезнь является одной из трех основных причин смерти женщин в возрасте от 15 до 44 лет.

В 2014 году около 80% зарегистрированных случаев туберкулеза зафиксированно в 22 странах. Шесть стран, в которых был зарегистрирован самый высокий уровень заболеваемости в 2014 году - это Индия, Индонезия, Нигерия, Пакистан, Китай и Южная Африка. В некоторых странах наблюдается значительное уменьшение числа случаев заболевания например, Бразилия и Китай входят в число 22 стран, где на протяжении последних 20 лет наблюдается устойчивое снижение заболеваемости туберкулезом. В то же время в других странах число случаев заболевания снижается очень медленно [3].

Широко используемая в мире вакцина БЦЖ (Bacillus Calmette - Guérin, BCG) играет существенную роль в профилактике туберкулеза, однако при определенных обстоятельствах она недостаточно эффективна в предотвращении диссеминированных форм заболевания, особенно у лиц с признаками иммунологической недостаточности [4, 5].

Сохраняющееся эпидемиологическое неблагополучие по туберкулезу, недостаточная результативность его терапии и стремительное распространение лекарственно-устойчивых

форм инфекции свидетельствуют о необходимости разработки нового поколения профилактических и лечебных противотуберкулезных вакцин, в частности векторных.

Основываясь на концепции нового подхода создания векторных вакцин, НИИПББ совместно с НИИ гриппа МЗ России создали «модельный» гриппозный вектор на основе вакцинного штамма А/Пуэрто-Рико/8/34 (H1N1): вирусный штамм является дефектным по репликации за счет модификации NS1 белка и эффективно экспрессирует микобактериальные белки с открытой рамки считывания NS1 гена. В этом плане перспективным выглядит создание таких препаратов на основе гриппозных векторов, экспрессирующих наиболее актуальные антигены, в частности, такие как Esat6 и Ag85A.

Вновь разработанные вакцины перед их использованием, так же как и другие лекарственные препараты, проходят обширные доклинические и клинические испытания для изучения их максимальной безопасности и эффективности. Первоначальные испытания проводятся на животных, затем исследуются в нескольких фазах клинических испытаний на человеке [6,7].

Одним из важнейших параметров доклинического исследования является изучение аллергенности лекарственного средства. Изучение аллергенности вакцинного препарата TB/FLU-04L было проведено в соответствии с правилами GLP (Надлежащая лабораторная практика) и правилами проведения доклинических (неклинических) исследований биологически активных веществ Республика Казахстан с использованием плацебо-контроля [8,9].

Целью данного исследования являлось изучение аллергенности вакцинного препарата TB/FLU-04L при интраназальном введении лабораторным животным.

Материалы и методы

В работе использовали экспериментальную серию TB/FLU-04L векторной вакцины для профилактики туберкулеза у людей. Исследуемый препарат представляет собой жидкую форму в виде раствора для интраназального применения, контролем служило, плацебо – SPGN буфер.

Испытания проводили на двух видах лабораторных животных обоего пола: белых мышах живой массой 25-30 г и морских свинках 6-8 нед возраста массой 350-400 г.

1. Определение гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ)

Влияние препарата на развитие аллергической реакции замедленного типа проводили на лабораторных мышах обоего пола, в равных количествах в каждой группе. Через 1 час после однократного интраназального (и/н) введения вакцинного препарата TB/FLU-04L в дозах $10^{7.5}$ ТИД/животное и $10^{9.5}$ ТИД/животное, мышей сенсibilизировали подкожно в межлопаточную область эритроцитами барана (ЭБ) в дозе $2 \times 10^8/0,2$. На пятые сутки после сенсibilизации мышам в подушечку задней левой лапки вводили 50 мкл ЭБ (10^8 клеток/мышь) (разрешающая доза), в заднюю правую – 50 мкл стерильного физиологического раствора. Схема введения исследуемых образцов вакцинного препарата TB/FLU-04L лабораторным мышам при изучении ГЗТ представлена в таблице 1.

Перед введением, после введения разрешающей дозы ЭБ и через 24 ч оценивали острую воспалительную реакцию на лапках мышей. Животных подвергали эвтаназии методом декапитации, после чего ампутировали обе лапы выше пяточного сустава и проводили взвешивание.

Индекс реакции вычисляли для каждого животного по формуле:

$$\text{ИР (в \%)} = (\text{О} - \text{К}) / \text{К} \times 100, \quad (1)$$

где О и К - масса стопы в опыте и контроле, в мг.

Разница в массе лап характеризует интенсивность реакции ГЗТ.

Таблица 1 - Схема изучения ГЗТ при введении вакцинного препарата ТВ/FLU-04L лабораторным мышам

Наименование образца	Дозы и метод введения	Группа	Число животных в группе
Исследуемый препарат	0,5 мл, и/н	1. Введение за 1 сут до сенсibilизации ЭБ	10
		2. Введение одновременно с ЭБ	10
		3. Введение через 1 сут после сенсibilизации ЭБ	10
Позитивный контроль	ЭБ в дозе 2×10^9 клеток, в/в	-	12
Негативный контроль	Полионный буферный раствор с pH 7,4 в дозе 0,5 мл, и/н	1. Введение за 1 сут до сенсibilизации ЭБ	10
		2. Введение одновременно с ЭБ	10
		3. Введение через 1 сут после сенсibilизации ЭБ	10

2. Определение гиперчувствительности немедленного типа (ГНТ) (анафилактический шок)

С целью сенсibilизации морским свинкам вводили препарат в эффективной дозе $10^{7,5}$ ТИД₅₀ /животное (№ 1, n=10) и в дозе, в 10 раз ее превышающей - $10^{8,5}$ ТИД₅₀/животное (№ 2, n=10). Первое введение проводили интраназально, второе – через 21 сут, также интраназально, в соответствии со схемой двукратного применения препарата при вакцинации человека. Контрольной группе (№ 3, n=10) вводили по той же схеме двукратно буферный раствор. На 14-е сут после последнего интраназального введения, животным сенсibilизированных и контрольной групп вводили внутрисердечно (в/с) разрешающую дозу - $10^{9,0}$ ТИД₅₀ /животное.

Позитивным контролем (группа 4) служили 10 животных, которых сенсibilизировали однократным подкожным введением 0,1 мл нормальной лошадиной сыворотки (НЛС) и через 14 сут вызывали у них анафилактический шок введением внутрисердечно (в/с) разрешающей дозы НЛС в объеме 0,3 мл.

Гиперчувствительность немедленного типа оценивали по тяжести анафилактического шока в течение 30 мин после иммунизации. Тяжесть шока оценивали по анафилактическому индексу (баллу), по W.O. Weigle:

1. +/- - редкое почесывание лапами морды, взъерошивание шерсти, понижение температуры более, чем на 1°C .

2. +++ - частое почесывание лапами морды, возможно периодическое чихание, понижение температуры.

3. ++++ - спастический кашлевой синдром, возможное падение на бок, мочеиспускание, дефекация.

4. +++++ - конвульсивные судороги, резкое нарушение дыхания, гибель животного в течение первых 5 – 7 мин.

5. -/- реакция отсутствует.

Индекс тяжести реакции (И) в группе рассчитывали по формуле W.O. Weigle:

$$И = [(A \cdot 1) + (B \cdot 2) + (C \cdot 3) + (D \cdot 4)] / (A + B + C + D), \quad (2)$$

где А, В, С, D – число животных с данной выраженностью синдрома.

Схема опыта на морских свинках при изучении реакции общей анафилактики представлена в таблице 2.

Таблица 2 - Схема опыта на морских свинках при изучении реакции общей анафилактики

№ группы	Название группы	Способ введения	Способ введения разрешающей дозы препарата	Число животных в группе
1	TB/FLU-04L $10^{7,5}$ ТИД ₅₀ /животное	двукратно интраназально с интервалом в 21 сут	TB/FLU-04L $10^{9,5}$ ТИД ₅₀ /животное, через 14 сут, в/с	10
2	TB/FLU-04L $10^{8,5}$ ТИД ₅₀ /животное			10
3	Буферный раствор			10
4	Позитивный контроль - 0,1 мл НЛС	однократно подкожно	0,3 мл НЛС, через 14 сут, в/с	10

Результаты исследований и их обсуждение

1. Результаты определения ГЗТ

В ходе исследований общее физиологическое состояние животных было удовлетворительным. Аппетит и употребление воды животными опытной группы были сопоставимы с данными контрольной группы (негативный контроль).

Результаты статистической обработки полученных данных при изучении ГЗТ представлены в таблице 3 и 4.

Таблица 3 – Масса лап белых мышей подгруппы негативного контроля

Исследуемое вещество	Время инокуляции	Пол животных	Эритроциты барана ($2 \cdot 10^9$)
Апирогенный физиологический раствор	За сутки	Самки	0,1848
		Самцы	0,1926
	Одновременно	Самки	0,1827
		Самцы	0,1915
	После суток	Самки	0,1792
		Самцы	0,1872
Эритроциты барана ($2 \cdot 10^9$)	На 5 сут	Самки	0,1918
	На 5 сут	Самцы	0,2023

Таблица 4 – Масса лап белых мышей иммунизированной вакциной TB/FLU-04L

Исследуемое вещество	Время иммунизации	Пол животных	Эритроциты барана ($2 \cdot 10^9$)	Индекс отека
TB/FLU-04L	За сутки	Самки	0,1652	-10,5
		Самцы	0,1721	-10,6
	Одновременно	Самки	0,1629	-10,8
		Самцы	0,1734	-9,4
	После суток	Самки	0,1662	-7,25
		Самцы	0,1718	-8,2

Полученные отрицательные данные индекса отека доказывают, что введение вакцины не вызывает развития аллергической реакции по замедленному действию. Сравнение полученных данных показывает, что исследуемый препарат в дозе $10^{7,5}$ ТИД₅₀ и в дозе, в 10 раз ее превышающей - $10^{8,5}$ ТИД₅₀ не обладает стимулирующим либо ингибирующим действием в отношении реакции гиперчувствительности замедленного типа у мышей. Индекс реакции отека статистически значимо не отличался от такового у животных из контрольной группы.

2. Результаты определения ГНТ (реакции общей анафилаксии)

ГНТ оценивали по тяжести анафилактического шока в течение 30 мин после разрешающей в/с инъекции на 14-й день после последнего интраназального введения животным всех групп. Результаты определения гиперчувствительности немедленного типа представлены в таблице 5.

Таблица 5 - Тяжесть шока по анафилактическому индексу (баллу), по W.O. Weigle

№ группы	Название группы	Индекс тяжести
1	TB/FLU-04L $10^{7,5}$ ТИД ₅₀ /животное	-
2	TB/FLU-04L $10^{8,5}$ ТИД ₅₀ /животное	-
3	Буферный раствор	-
4	Позитивный контроль - 0,3 мл НЛС	++++

Общее состояние животных опытных групп № 1, 2, 3, было удовлетворительным. Аппетит и потребление воды были сопоставимы с данными контрольной группы. Интенсивность и характер двигательной активности, координация движений, тонус скелетных мышц сохранялись на прежнем уровне. Поведенческие реакции не отклонялись от нормы. Реакция на тактильные, болевые, звуковые и световые раздражители оставались в пределах физиологической нормы, состояние волосяного и кожного покрова, окраска слизистых были без видимых изменений. В ходе наблюдения отмечено отсутствие изменения общего состояния у экспериментальных животных после внутрисердечного введения разрешающей инъекции вакцинного препарата TB/FLU-04L $10^{9,5}$ ТИД₅₀.

Введение разрешающей дозы НЛС в объеме 0,3 мл в группе № 4 (позитивный контроль) сопровождалось явлениями общей анафилаксии в виде частого почесывания лапами морды, взъерошивания шерсти, конвульсивных судорог, резкого нарушения дыхания. Животные группы позитивного контроля погибли в течение первых 5 - 7 мин.

Таким образом, при изучении ГНТ вакцинного препарата в исследуемых дозах отмечено отсутствие изменений общего состояния экспериментальных животных, признаки даже умеренного шока не были выявлены ни у одного животного опытных групп.

Вывод

Учитывая данные, полученные в исследованиях ГЗТ и ГНТ векторной вакцины TB/FLU-04L для профилактики туберкулеза у людей, можно сделать вывод, что вакцина не оказывает алергизирующего влияния на организм экспериментальных животных.

Литература

1. Raviglione M., Marais B., Floyd K., Lönnroth K., Getahun H., Migliori G.B., Harries A.D., Nunn P., Lienhardt C., Graham S., Chakaya J., Weyer K., Cole S., Kaufmann S.H., Zumla A. Scaling up interventions to achieve global tuberculosis control: progress and new developments. // Lancet. – 2012. – V. 379(9829). – P. 1902-1913.

2. *Рахматулин О.А.* Анализ заболеваемости туберкулезом в Республике Казахстан [Электрон.ресурс]. – URL: iwer.kz/index.php?newsid=129.
3. Тематический обзор о туберкулезе. Всемирная Организация Здравоохранения [Электрон.ресурс]. – URL: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs104/ru/>.
4. *Baldwin S.L., Bertholet S., Reese V.A., Ching L.K., Reed S.G., Coler R.N.* The importance of adjuvant formulation in the development of a tuberculosis vaccine // *J Immunol.* –2012; – V. 188(5). – P. 2189-2197.
5. WHO “Report of the expert consultation on immunotherapeutic interventions for tuberculosis. Geneva. 2007. Library Cataloguing-in-Publication Data.
6. *Медуницын Н.В.* Разработка новых вакцин против туберкулеза [Электрон.ресурс]. – сайт ГИСК им. Л.А.Тарасевича.–2005. – С.1-3.
7. *Мионов А.Н., Бунятян Н.Д., Васильева А.Н., Верстакова О.Л.* Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. – М.: Грифи К, 2012. – С. 13-15.
8. «Правила доклинической оценки безопасности фармакологических средств (GLP)». –М., 1992.
9. Правила проведения доклинических (неклинических) исследований биологически активных веществ от 19 ноября 2009 г. Приказ №745 РК.

**Богданов Н.В., Хайруллин Б.М., Касенов М.М., Волгин Е.Н., Нурпейсова А.С.,
Сарсенбаева Г.Ж., Исагулов Т.Е. Сағымбай А.Б., Әбітай Р.Т.**

ӨКІПЕ ТУБЕРКУЛЕЗІНІҢ ПРОФИЛАКТИКАСЫНА АРНАЛҒАН ТВ/FLU-04L ВЕКТОРЛЫҚ ВАКЦИНАНЫҢ АЛЛЕРГЕНДІЛІГІН ЗЕРТТЕУ

Аңдатпа

Аталмыш мақалада Биологиялық қауіпсіздік проблемаларының ғылыми-зерттеу институтының базасында дайындалған өкпе туберкулезінің профилактикасына арналған ТВ/FLU-04L вакцинасының аллергенділігін анықтау нәтижелері көрсетілген. Вакцинаның аллергендігін баяу типті гипер сезімділік және лездік типті гипер сезімділік реакцияларының зерттеу нәтижесінде ешқандай аллергиялық реакциялар байқалмайтыны анықталды.

Кілт сөздер: туберкулез, вакцина, профилактика, аллергенділік.

**Bogdanov N.V., Khairullin B.M., Kassenov M.M., Volgin Ye. N., Nurpeisova A. S.,
Sarsenbayeva G.Zh., Issagulov T.E., Sagymbay A.B., Abitay R.T.**

STUDY ALLERGENS VECTOR VACCINE TB / FLU-04L TO PREVENT TUBERCULOSIS IN PEOPLE

Annotation

The results of pre-clinical research study allergenicity vector TV/FLU-04L vaccine for the prevention of tuberculosis in humans, developed by the Research Institute for Biological Safety

Problems. The study of allergens in immediate hypersensitivity reactions and immediate hypersensitivity found that the vaccine does not have allergenic properties.

Keywords: tuberculosis, vaccine, prevention, allergenicity.

УДК: 577.3

Dagarova Sh.S., TSitpayeva G.

*al-Farabi Kazakh national university, faculty of biology and biotechnology,
RSE "Institute of botany and phytointroduction" CS MES of Republic Kazakhstan, Almaty*

ANATOMIC RESEARCH IN RARE SPECIES OF *RHEUM WITTROCKII* LUNDSTR

Abstract

In the article the tables, charts and figures on the results of research of about *Rh.wittrockii*. General view of the status of this population decreases and the list of rare species. Also anatomic research the underground organs root of endangered and rare species of *Rh.wittrockii*. In this article about development of the root structure in different age of plants. The article shows the comparative results. In the period of juvenile life cycle of the plant all the cells in forms of

conducting bundles $38,02 \pm 4,03$ result to shown. Also all the cells in forms ectoderm $22,55 \pm 2,83$ and cells of mezoderm $15,65 \pm 2,03$ were shown. In the period of the size of the development of capacity in cells in the roots of *Rh. wittrockii* cells of conducting bundles in virginal life cycle of plants $57,77 \pm 5,97$. Also all the cells in forms ectoderm $34,07 \pm 9,47$ and cells of mezoderm $17,58 \pm 2,54$. Also in article introduction showed general herbarium collections for storage genus of *Rheum* plants in Institute "Botany and phytointroduction". In there 10 species *Rheum* L genus the flora of Kazakhstan.

Keywords: *Rheum wittrockii* Landstr, biodiversity, virginal, juvenile, in-situ, flora, conservation

Introduction

The genus has about 50 species over whelming majority of them is found in Asia in Kazakhstan some species have in flora [1, 2]. Also herbarium fund in institute "Botany and phytointroduction" storage herbarium collections genus of *Rheum* plants. Endangered and rare species of *Rheum wittrockii* Lundstr including in a Red book in our Kazakhstan [3]. In situ – conservation of wild populations and also ex-situ it's creation of seed banks and cultivation in living collections of botanical gardens and locals plant nurseries. Present day in Institute "Botany and phytointroduction" mountain are planted plants at the institute on the Rock garden exhibition presents about 200 species of native flora and over 100 species and cultivars, widely used in the culture of herbaceous perennials, and miniature shrubs. In this Rock garden were planted mountainous endangered and rare species plant of *Rheum wittrockii* Lund str. This methods of conservation very importantly for the propagation a lot of important plants in our flora [4]. The life form *Rh.wittrock* herbaceous rhizome polycarpic. The spread in Kazakhstan. Dzhungar Alatau [5, 6, 7]. Comparative characteristic of plants, anatomical structure of the leaf blade *Rheum wittrockii* Lundstr in two variants [8].