

УДК 615.371:57.083.2

ВИВЧЕННЯ БЕЗПЕЧНОСТІ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНИХ ЛІПОСОМАЛЬНИХ ВІРУСНИХ ВАКЦИН

Інститут мікробіології та імунології ім. І. І.
Мечникова НАМНУ

Романова О. А., Давидова Т. В., Кліса Т. Л.,
Кліса А. О.

Вступ

З розвитком транспортних сполучень між країнами та континентами створились нові умови для активних міграційних процесів, спілкування, що вивело на новий етап проблему швидкого глобального розповсюдження інфекцій. Тому питання поширення респіраторних вірусних інфекцій, особливо грипу, постає як першочергове, зважаючи на миттєвий розвиток хвороби, тривалі та тяжкі ускладнення, високий рівень летальності, обумовлюють великі соціально-економічні збитки від епідемій та пандемій [1].

Єдиним методом контролю за поширенням грипозної інфекції є вакцинопрофілактика [1,2]. Пошук та розробка ефективних і безпечних вакцин має велике значення. На базі ДУ «Інститут мікробіології та імунології ім. І. І. Мечникова Національної Академії медичних наук України» в межах наукової теми «Розробка нових підходів щодо створення вірусних вакцин, вивчення залежності їх специфічної активності від типу та ступеню модифікації компонентів» НАМН 112/2013 № держреєстрації 0113U001518 було створено декілька експериментальних протигрипозних вакцинних препаратів з подальшою модифікацією компонентів, для обрання найоптимальнішого зразку за безпечністю та імуногенністю. Результати етапу дослідження безпечності найефективніших зразків будуть викладені у тексті статті.

Матеріали та методи

Поряд із високою імуногенністю вакцинного препарату, важливим критерієм є його безпечність для застосування [3,4].

При здійсненні оцінки безпечності протигрипозних вакцин використовують декілька критеріїв, зокрема, реактогенність, що оцінюється за частотою місцевих та системних побічних (несприятливих) ефектів, котрі обумовлені її введенням [5], а також, стосовно препаратів з ліпідним вмістом, їх здатність впливати на процеси окиснення.

На даному етапі дослідження проводили визначення:

а) реактогенності вакцинних препаратів за критеріями місцевої та системної реакції та реакцією гіперчутливості уповільненого типу (ГУТ) (foot pad swelling assay) [3,6];

б) активності процесів перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ) та білків крові після

введення офіцинальних та експериментальних вакцинних препаратів (вмісту карбонільних груп білків, гідроперекисів ліпідів, активності глутатіон-пероксидази).

Об'єкти дослідження

Об'єктом дослідження були тривалентні офіцинальні сезонні вакцини для профілактики грипу: «Ваксігріп» (Авентіс Пастер, Франція), «Інфлексал В» (Берна Біотех ЛТД, Швейцарія) та експериментальні вакцинні зразки, отримані на основі антигенного складу вищезазначених офіцинальних препаратів. У ході експериментального дослідження вакцини, що мали найвищу імуногенність зазнали подальшого удосконалення та модифікації [7]. Отже, дослідними зразками слугували новостворені експериментальні ліпосомальні грипозні вакцини під умовними назвами:

Ліпос 2 – експериментальна грипозна вакцина з негативним зарядом ліпосом та антигенним складом східним до спліт-вакцини «Ваксігріп»

Ліпос 2.1 – ад'ювантна, з модифікованою ліпосомальною складовою (вбудовані молекули етонію та хлорофіліпту у ліпосомальну оболонку)

Ліпос 2.2 – подальша модифікація завдяки ацилюванню антигенної складової [7-9].

Дослідження реактогенності проводилося на лінійних статевозрілих мишах обох статей, вагою 20-22 г, що були розділені на групи по 15 особин. Дослідження перекисного окиснення ліпідів та білків було проведено на лінійних статевозрілих щурах обох статей, вагою 160-220 г, що були розділені на групи по 10 особин. Дослідження проводили в умовах контролю за факторами довкілля. Тварин утримували при постійній температурі (20-25 °С) та відносній вологості повітря (50-70%). Раціон та якість води були стандартними, доступ до води був необмеженим. Тварини були розміщені у клітках групами за статтевою ознакою. Усі роботи з тваринами проводились згідно ОСТ 42 1-88 «Тварини лабораторні. Технологічний процес» з дотриманням основних положень Конвенції Ради Європи про охорону хребетних тварин, що використовуються в експериментах та інших наукових цілях від 18.03.1986, Директиви ЄС № 609 від 24.11.1986 р. і МОЗУ №281 від 01.11.2000р. [10].

Дослідження реактогенності обраних експериментальних зразків

За для оцінки алергізуючих властивостей новостворених ліпосомальних вакцинних препаратів застосували foot pad swelling assay - тест на припухлість стопи, що є тестом для виявлення гіперчутливості уповільненого типу (ГУТ) у мишей [3, 6].

Відомо, що інтенсивність реакцій гіперчутливості уповільненого типу (ГУТ) до хімічних сполук, а також їх тривалість залежать від термінів формування та поєднаної дії різних субпопуляцій Т-супресорів, що пригнічують ГУТ. Тому при індукції ГУТ шляхом введення мишам алергенів у повному ад'юванті Фрейнда (ПАФ), при

якому не відбувається формування Т-супресорів, можливе посилення шкірних алергічних реакцій та виявлення алергенних властивостей навіть слабких хімічних алергенів. Мишей сенсibilізували одноразово, внутрішньошкірно, в основу хвоста, 60 мкл емульсії препарату в ПАФ, еквівалентній 10-кратній дозі розчину в ПАФ у співвідношенні 1:1. Для приготування такої емульсії використовували розчин Хенкса рН 7,5 [3].

Для виявлення сенсibilізації через 5 діб мишам у подушечку задньої лапи вводили 40 мкл 10 % розчину тест-препарату в розчині Хенкса. Через 6-12-24 години після тестування вимірювали величину набряку за допомогою інженерного мікрометра МК-0-25. За різницею у товщині інтактної та неінтактної лапок робили висновок про інтенсивність реакції ГУТ [3].

Контрольних тварин сенсibilізували емульсією ПАФ з розчином Хенкса без препаратів за тією ж схемою, що в досліді.

В роботі використовувався ПАФ виробництва фірми Difco (USA) [11].

Дослідження стану окисних процесів у периферичній крові тварин за введення експериментальних вакцин

Вимірювання вмісту карбонільних груп білків. Зміст карбонільних груп білків визначали з 2,4-днітрофенілгідрaziном за методом [9]. Пофарбовані проби реєстрували на двопробеному спектрофотометрі Srescord UV VIS проти контролю (проба без 2,4-днітрофенілгідрaziна) в діапазоні довжин хвиль від 330 нм до 625 нм. Вимірювали різницю екстинкції при 360 нм і 550 нм і розраховували зміст карбонільних груп білків, використовуючи коефіцієнт молярної екстинкції $22 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.

Вимірювання вмісту гідроперекисів ліпідів (ГПЛ). Вміст ГПЛ у периферичній крові визначали за методом [9]. Спектр поглинання забарвленого продукту записували на двопробеному спектрофотометрі Srescord UV VIS, вимірюючи різницю екстинкції при 535 і 520 нм. Вміст ГПЛ виражали в еквівалентних кількостях МДА, використовуючи коефіцієнт молярної екстинкції $1,56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$. Визначення активності глутатіон-пероксидази (КФ 1.11.1.9) проводили у сироватці крові спектрофотометрично при 340 нм за методом [9] у 50 мМ K^+ , Na^+ -фосфатному буфері (рН 7,4), що містив 1 мМ ЕДТА, 0,15 мМ NADPH, 1 од. глутатіонредуктази дріжджів, 0,2 % тритону X-100 і

3 мМ азиду Na для інгібування КАТ. Гідроперекис кумола додавали у концентрації 1,2 мМ, перекис водню - 0,4 мМ. Температура - 37°C. Активність виражали у нмоль NADPH/хв на мг білку або мл сироватки з урахуванням коефіцієнта молярної екстинкції $6,22 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.

Статистична обробка отриманих даних. 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 наведені у вигляді середнього геометричного значення M та середньоквадратичного відхилення σ .

Результати та обговорення

Оцінка реактогенності модифікованих вірусних вакцин за гіперчутливістю уповільненого типу

Для оцінки небажаних, але ймовірних алергізуючих властивостей відібраних за критерієм найвищої імуногенності новостворених ліпосомальних вакцинних препаратів було застосовано foot pad swelling assay - тест на припухлість стопи, що є тестом для виявлення ГУТ у лінійних мишей [3,4,6]. У результаті дослідження визначено стосовно частоти місцевих реакцій, оцінених шляхом візуальних спостережень у піддослідних тварин, що місце ін'єкції, як офіційних так і новостворених зразків не характеризувалося утворенням набряку, затвердінням тканини, гіперимією чи локальними болісними реакціями на протязі всього часу спостереження. У піддослідних мишей також не було зареєстровано підвищення температури тіла на протязі 5 діб після маніпуляцій, яке є основним критерієм побічних системних реакцій при введенні вакцинних препаратів. Також після застосування експериментальних препаратів та препаратів порівняння, суб'єктивно не відбувалося відхилень у загальному стані тварин, у тому числі не відбувалося зниження апетиту, розладів травлення, зміни активності тощо. Подібні спостереження, однак, не дають змогу зробити висновок про повну безпечність застосування експериментальних новостворених вакцинних препаратів і потребують додаткових оціночних тестів.

Таблиця 1 – Оцінка реактогенності новостворених та офіційних вакцинних препаратів

Вакцинні препарати, (n=11)	Години реєстрації, %	6-та год	12-та год	24-год
«Ваксігріп»		17	9	0
«Інфлексал В»		6	3	0
Ліпос №2		6	4	0

Ліпос №2.1	7	3	0
Ліпос №2.2	7	3	0
Фізіологічний розчин	1,0	0	0

Досліджуючи реактогенність новостворених вакцин із додаванням ад'ювантів та антигенною модифікацією, було встановлено прийнятний індекс реакції ГУТ при застосуванні усіх дослідних зразків.

Індекс реакції через 6 годин після введенні ліпосомальних модифікованих зразків знаходився на одному рівні із офіційною ліпосомальною вакциною «Інфлексал В». На 12-ту годину після індукції ГУТ індекс реакції після застосування більшості дослідних та офіційних зразків зменшився вдвічі. На 24-ту годину після ініціації ГУТ вже не спостерігалось жодних ефектів реакції, а ні при застосуванні дослідних модифікованих ліпосомальних зразків, а ні при імунізації офіційними вакцинними препаратами.

Таким чином, модифікація ліпосомального носія, антигенного складу та включення ад'ювантів – хлорофіліпту та етонію – котрі призводять до підвищення імуногенності вакцин, не викликають збільшення реактогенності.

Вивчення показників перекисного окиснення білків та ліпідів при введенні модифікованих ліпосомальних протигрипозних вакцин

У якості базової складової для побудови ліпосом експериментальних вакцин у роботі використовувався фосфатиділхолін (ФХ). Фосфатиділхолін є субстратом для активації процесів перекисного окиснення ліпідів. Лецитинові ліпосоми, що є структурно-функціональними компонентами ліпосомальних вакцин, піддаються впливу цілого ряду фізичних і хімічних факторів [12, 13]. Однією з біохімічних подій, що відбуваються з ними, є перекисне окиснення ліпідів, що супроводжується появою вільних радикалів в системі та, у кінцевому рахунку, викликає деградацію бішарових фосфоліпідних мембран шляхом порушення їх проникності та лізису [8]. У зв'язку з цим система контролю за безпечністю та ефективністю ліпосомальних препаратів повинна включати визначення вмісту в них продуктів ПОЛ. Саме тому ми оцінювали стан перекисного окиснення ліпідів та білків, а також активність антиоксидантного ферменту при застосуванні зразків новостворених вакцинних препаратів із ліпосомальною модифікацією та в подальшому із комбінацією модифікацій введенням ад'ювантів та зміни антигенного складу. Підвищення первинних та вторинних продуктів перекисного окиснення ліпідів та білків у крові внаслідок введення ліпосомальних препаратів здатне знижувати їх терапевтичну ефективність. Так, підвищення концентрації малонового діальдегіду (МДА) значно зменшує ефективність хіміотерапії ліпосомальними препаратами [14, 15].

Перекисне окиснення є процесом метаболічних взаємодій високо-реактогенних

вільних радикалів з біомолекулами, що відбувається в організмі за нормального, фізіологічного стану, але іноді ці радикали здатні вступати до альтернативних реакцій. До первинних радикалів належать такі, що утворюються в клітинах ферментативним шляхом, а саме радикали кисню (супероксид та гідроксильний радикал), монооксид азоту, радикали, що утворюються в окиснювально-відновних реакціях (убіхінол). Вторинні радикали утворюються в ході неферментативних реакцій іонів заліза: гідроксил-радикали та радикали ліпідів. Їх утворення також може спричинюватися за дії ультрафіолету та в ході метаболізму деяких препаратів. Також за певних умов можуть виникати порушення системи ферментів, що каталізують утилізацію вищезазначених вільних радикалів, зокрема зниження активності супероксиддисмутази (СОД) або ферментних систем, що зв'язують іони заліза у плазмі крові (церулоплазміну, трансферину) та у клітинах (феритину). У такому випадку супероксидні радикали та перекис водню вступають в низку альтернативних реакцій: утворення двовалентного заліза з тривалентного, реакція перекису водню й гіпохлориту з іонами двовалентного заліза. Безпосередніми попередниками гідроксильного радикалу, який ініціює ланцюгове окиснення ліпідів, служать іони двовалентного заліза і перекис водню. З цієї причини утворення радикала гідроксилу і пероксидація ліпідів гальмуються речовинами, що знижують концентрацію одного з цих двох сполук. До них, зокрема, належать глутатіон-пероксидаза, що утилізує перекис водню, запобігаючи розгалуженню ланцюгів окиснення ліпідів в мембранах. Дія глутатіон-пероксидази зводиться до відновлення гідроперекисної групи жирної кислоти до спиртової з одночасним окисленням глутатіону (GSH) до дисульфіду (GSSG). Ефективність роботи глутатіон-пероксидази залежить від концентрації вільного глутатіону, при зниженні якої може зростати концентрація цитотоксичних гідроксильних радикалів. Отже, при дослідженні вмісту гідроперекисів ліпідів (ГПЛ), які виступають первинними продуктами пероксидації, було зареєстровано достовірно підвищений їх вміст у сироватці крові імунізованих щурів при застосуванні більшості досліджуваних експериментальних модифікованих ліпосомальних вакцин та виробничих вакцин (табл. 2). Виключення склала група тварин, яким вводили експериментальну модифіковану вакцину «Ліпос 2.2». Значення рівня гідроперекисів ліпідів у даному випадку були на рівні значень у інтактних тварин - $(3,7 \pm 0,15)$ ммоль МДА/1 мл сироватки проти $(3,58 \pm 0,21)$ ммоль МДА/1 мл сироватки відповідно, $(p \leq 0,05)$. За введення вакцини «Інфлексал В» відмічалася тенденція до збільшення цього показника - $(4,0 \pm 0,33)$ ммоль МДА/1 мл сироватки, але достовірних

відмінностей від інтактного контролю зареєстровано не було. Щодо вмісту карбонілів білків, які є характеристикою перекисного окиснення протеїнів, ініційованого пероксидацією ліпідів, були отримані відповідні результати, а саме у групі тварин,

імунізованих вакциною «Ліпос 2.2» цей показник був на тому ж рівні, що і у групи, яка отримала фізіологічний розчин: $(2,52 \pm 0,20)$ нмоль КБ/мг білку проти $(2,41 \pm 0,30)$ нмоль КБ/мг білку, відповідно, $(p \leq 0,05)$.

Таблиця 2 – Вміст продуктів перекисного окиснення ліпідів та білків й активність глутатіон-пероксидази 3 у сироватці крові щурів при застосуванні експериментальних вакцин із модифікаціями у ліпосомальному носії, $(M \pm \sigma)$, $(n=33)$.

Вакцинні препарати	ГПЛ ммоль МДА/1 мл сироватки	Карбоніли білків нмоль КБ/ мг білку	GPx3 мкмоль НАDPH/мин×мл
«Ваксігрип»	$(4,20 \pm 0,43)^1$	$(3,20 \pm 0,49)^1$	$(4,90 \pm 0,28)$
«Інфлексал В»	$(4,0 \pm 0,33)^2$	$(3,22 \pm 0,3)^1$	$(4,8 \pm 0,51)$
Ліпос №2	$(3,7 \pm 0,22)^1$	$(2,58 \pm 0,2)^1$	$(4,85 \pm 0,33)$
Ліпос №2.1	$(3,97 \pm 0,15)$	$(3,06 \pm 0,36)$	$(4,06 \pm 0,52)$
Ліпос №2.2	$(3,7 \pm 0,27)^1$	$(2,52 \pm 0,27)^1$	$(4,9 \pm 0,54)^1$
Фізіологічний розчин	$(3,58 \pm 0,21)$	$(2,41 \pm 0,30)$	$(4,78 \pm 0,36)$

Примітки: ¹⁾ - достовірність відмінності даних від інтактної групи, $(p \leq 0,05)$. ²⁾ - тенденція до збільшення або підвищення значень у порівнянні з інтактною групою $(p \leq 0,1)$.

Важливим показником антиоксидантної здатності організму є стан ферментативної активності глутатіон-пероксидази 3 (Gpx3), що демонструє здатність до утилізації перекису водню, обмежуючи розгалуження ланцюгів окиснення ліпідів у мембранах. Загалом при дослідженні ферментативної активності Gpx3 було показано, що застосування більшості ліцензованих і модифікованих вакцин не призводить до значної відмінності його рівня, як у імунізованих так і у інтактних тварин.

Проте, при імунізації тварин модифікованою вакциною Ліпос №2 ферментативна активність Gpx3 була зниженою – $(2,75 \pm 0,54)$ мкмоль НАDPH/хв×мл у порівнянні з групою, якій вводили фізіологічний розчин $(4,78 \pm 0,36)$ мкмоль НАDPH/хв×мл відповідно, $(p \leq 0,05)$. При цьому, якщо порівнювати ефекти, які впливали на активність глутатіон-пероксидази введенням досліджуваних вакцин, стає помітною тенденція до підвищення вказаного ферменту у модифікованої форми ліпосомальної вакцини «Ліпос №2.2» $(4,9 \pm 0,33)$ мкмоль НАDPH/хв×мл у порівнянні з $(4,9 \pm 0,28)$ мкмоль НАDPH/хв×мл, $(p \leq 0,1)$.

Таким чином, дослідження вмісту первинних продуктів пероксидації ліпідів та білків з оцінкою рівня активності антиоксидантного ферменту дозволяє оцінити безпечність їх застосування та надає більшої інформативності щодо біологічних ефектів, які відбуваються за введення модифікованих ліпосомальних протигрипозних вакцин в експерименті.

В результаті цього дослідження були охарактеризовані певні переваги модифікованої ліпосомальної вакцини «Ліпос №2.2» над іншими

експериментальними препаратами, а також низкою офіційних зразків при оцінці їх біологічної дії на процеси окиснення в організмі.

Висновки

Серед вакцинних препаратів, з модифікацією антигенної складової та додаванням ад'ювантів, найвища продукція специфічних протигрипозних антитіл спостерігалася після введення зразку Ліпос №2.2, що був виготовлений на основі антигенного складу вакцини Ваксігрип з негативно зарядженою ліпосомальною композицією та додаванням ад'ювантів і модифікованим антигенним складом, друге місце посіла Ліпос №2.1, без модифікації антигенного складу.

Безпечність дослідних препаратів було оцінено за критерієм здатності викликати підвищення продуктів пероксидації ліпідів та білків у результаті модифікації (застосування ад'ювантної системи та змінення антигенного складу), а також за розвитком загальних і місцевих реакцій (foot pad swelling assay - тест на припухлість стопи, що є тестом для виявлення гіперчутливості уповільненого типу (ГУТ) та оцінка загального стану тварин після імунізації).

Додавання до модифікованого ліпосомального зразка Ліпос №2 ад'ювантної системи хлорофіліпту та етонію (Ліпос №2.1) не призвело до достовірного підвищення первинних продуктів перекисного окиснення ліпідів – ГПЛ, ані по відношенню до Ліпос №2, ані по відношенню до офіційних препаратів – ліпосомального Інфлексал В та Ваксігрип – $(3,97 \pm 0,15)$ ммоль МДА/1 мл сироватки при введенні Ліпос №2.1 проти $(3,70 \pm 0,22)$ ммоль МДА/1 мл сироватки, $(4,0 \pm 0,33)$ ммоль МДА/1

мл сироватки та $(4,20 \pm 0,43)$ ммоль МДА/1 мл сироватки.

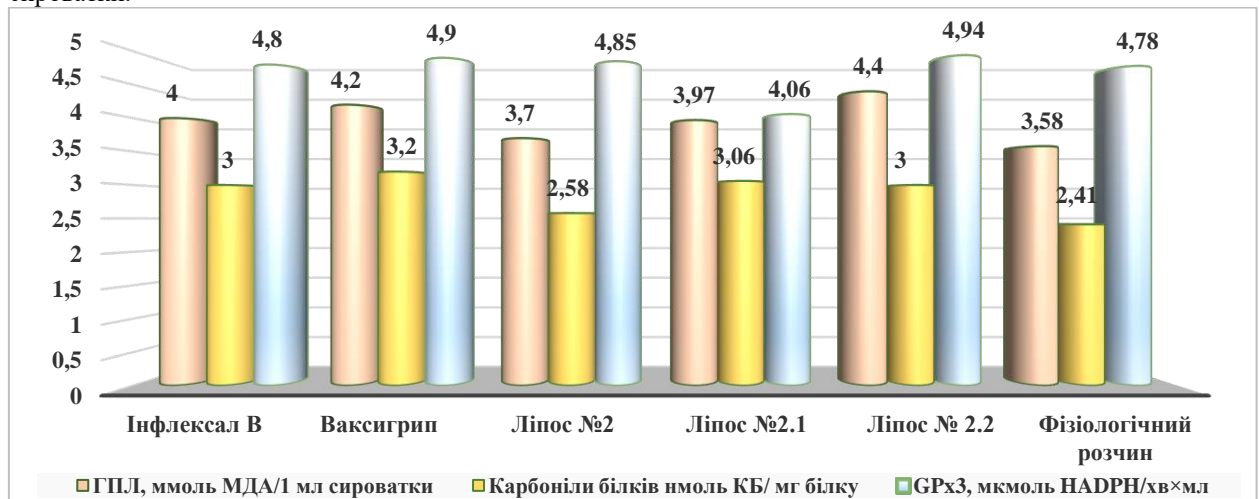


Рис. 1– Показники перекисного окиснення білків та ліпідів при введенні ліпосомальних протигрипозних вакцин модифікованих за антигенною складовою та додаванням ад'юванту.

Додавання ад'ювантів до ліпосомального зразка Ліпос №2, з отриманням вакцини Ліпос №2.1 також не призвело до зміни вмісту карбонілів білків – $(3,06 \pm 0,36)$ нмоль КБ/мг білку по відношенню до Ліпос №2 – $(2,58 \pm 0,20)$ нмоль КБ/мг білку, а також до офіційних зразків.

Досить значним є той факт, що за застосування Ліпос №2.2 не відбувалася інгібіція антиоксидантного ферменту глутатіон-пероксидази 3, як ми спостерігали при введенні ліпосомального модифікованого зразка Ліпос №2.1. Так, активність цього ферменту при введенні Ліпос №2.1 становила $(4,06 \pm 0,52)$ мкмоль НАДФН/хв×мл в порівнянні з Ліпос №2 – $(4,85 \pm 0,33)$ мкмоль НАДФН/хв×мл та Інфлексал В – $(4,80 \pm 0,51)$ мкмоль НАДФН/хв×мл. Тобто рівень активності глутатіон-пероксидази 3 новоствореного ліпосомального зразка 2го ступеню модифікації Ліпос №2.2 не мав достовірної відмінності від рівня активності цього ферменту при введенні шурам фізіологічного розчину.

Таким чином, експериментальні зразки протигрипозних ліпосомальних вакцин (без модифікації та з її використанням для ліпосомальної й антигенної складових) виявили відсутність підвищення рівнів первинних продуктів пероксидації ліпідів – гідроперексидів ліпідів та продуктів окиснення білків – карбонілів білків, а також відсутність значних ефектів інгібіції антиоксидантних ферментів у сироватці крові щурів. А також при дослідженні ГУТ була визначена достатня безпечність усіх досліджуваних зразків, що дозволяє використовувати даний зразок у подальшій роботі.

Перспективи подальших досліджень

Результати цього дослідження створюють можливість відродження та розвитку вітчизняної вакцинології. Однак, експериментальні зразки потребують подальшого вивчення, насамперед, більш детального вивчення безпечності, продовження доклінічних та клінічних досліджень.

Що дозволить ввести у виробництво вітчизняну протигрипозну вакцину, яка буде відповідати міжнародним стандартам за ефективністю та безпечністю.

References

1. Palese P. Orthomyxoviridae: The viruses and their replication/[Text]/P. Palese, M.L. Shaw// In Fields Virology, 5th ed. Lippincott Williams & Wilkins, a Wolters Kluwer Business: Philadelphia, PA, USA, 2007; Volume 2, pp. 1647–1689. WHO. Influenza (seasonal) fact sheet No211.
2. Davydova T.V. Features of the immune response during infections and prospects for the vaccines creation [Electronic resource] /T.V. Davydova/Annals of Mechnikov Institute – 2015 - N 4 – 25-39
3. Khabriev R.U. Manual on experimental (preclinical) study of new pharmacological substances. Second Edition [Text] / R.U. Khabriev // M. Medicine. - 60-64
4. Bektimirov T. A. Methods for determination of parameters quality of immunobiological drugs for the prevention and diagnosis of influenza. Guidelines [Electronic resource] /T.A. Bektimirov, N.I. Lonskaya, L.V. Agafonov, N.A. Kastrikin, N.A. Ozeretskovsky, N.V. Medunitsyn, A.A. Movsesyants // МУ 3.3.2.1758-03 28.09.03 www.OpenGost.ru
5. Lorenz C. Free diC14-amidine liposomes inhabit the TNF-alpha sedretonindused by Cp G sequences [Text] / C. Lorenz, M. Vanderbranden, M. Ouali, A. Legat, J. M. Ruysschaert, A. Eouahabi // Eur J Immunol. – 2006. - № 23 (3). – P. 227-234
6. Pauley T. Influence of a Concurrent Cognitive Task on Foot Pedal Reaction Time Following Traumatic, Unilateral Transtibial Amputation [Electronic resource]/ T. Pauley, M. Devlin// J Rehabil Med 2011; 43: 1020–1026
7. Volyansky A.Yu. Compared of Immunogenesity and protein composition of experimental and officinal vyrosomal influenza virus vaccine [Electronic resource]/ A.Yu. Volyansky, M.S. Pogorila, E.A.

- Romanova, T.V. Davidova, A.V. Martynov et al/ Annals of Mechnikov Institute. 2014. - T. 3. - 13–18.
8. Boudad H. Poly (isobutylc-tanacrylate) cyclodextrin combined nanoparticles for oral administration of saquinavir [Text] / H. Boudad, G. Ponchel, P. Legrand, D. Duchene// Proc. 3 rd World Meeting APV. - APGI, Berlin, 2000. - 24 p.
 9. Levine R. L. Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins / R. L. Levine, J. A. Williams, E. R. Stadtman, E. Shacter // Methods Enzymol. – 1994. – V. 233. – P. 346 – 357.
 10. On animals protection from cruelty [electronic resource]: Law of Ukraine 21.02.2006 № 3447-IV amended according to Law № 1759-VI (1759-17) 15.12.2009 // Supreme Council of Ukraine. – 2010. – №9. – 76. – <http://zakon.rada.gov.ua/cgi-bin/laws/main.cgi?nreg=3447-15>.
 11. Glenny, A. The antigenic value of toxoid precipitated by potassium-alum [Text] / A. Glenny, C. Pope, H. Waddington, V. Wallace // J Pathol Bacteriol. – 1926. – № 29. – P. 38–45.
 12. Henriksen-Lacey M. Liposomal vaccine delivery systems [Text] / M. Henriksen-Lacey, K. S. Korsholm, P. Andersen, Y. Perrie, D. Christensen // Expert Opin Drug Deliv. – 2011. – № 4. – P. 505–519.
 13. Bachmann M. F. Vaccine delivery: a matter of size, geometry, kinetics and molecular patterns [Text] / M. F. Bachmann, G. T. Jennings // Nat Rev Immunol. – 2010. – Vol. 10(11). – P. 787–796.
 14. Sharp F. A. Uptake of particulate vaccine adjuvants by dendritic cells activates the NALP3 inflammasome [Text] / F. A. Sharp, D. Ruane, B. Claass, E. Creagh, J. Harris, P. Malyala [et al] // Proc Natl Acad Sci U S A. – 2009. – № 3. – P. 870–875.
 15. Harris, J. The role of inflammasomes in the immunostimulatory effects of particulate vaccine adjuvants [Text] / J. Harris, F. A. Sharp, E. C. Lavelle // Eur J Immunol. – 2010. – № 3. – P. 34–38.

UDC 615.371: 57.083.2

EXPERIMENTAL LIPOSOMAL VIRAL VACCINE SAFETY

Romanova O.A., Davydova T.V., Klysa T.L., Klysa A.O.

Introduction. With the transport links development there is rather important issue respiratory viral infections spread, especially influenza. The only method controlling influenza is vaccination. Search and development effective and safe vaccines is important.

Material and methods. In base SO "Mechnikov Institute Microbiology and Immunology National Ukrainian Academy Medical Sciences" in the scientific theme "Developing new approaches to creating viral vaccines and study specific activity depending of type and degree component's modification" was created several experimental influenza vaccine with subsequent component's modification for selecting the most optimal pattern of safety and immunogenicity. In assessing the influenza vaccine safety is using a few criteria, including, reactivity, as measured by the frequency of local and systemic adverse (negative) effects, which due to its introduction, and for lipid

content drugs, ability to influence oxidation processes. At present study phase was determined: a) systemic reaction and local reaction of delayed-type hypersensitivity (foot pad swelling assay); b) lipids and proteins peroxidation processes after administration officinal and experimental vaccines (content protein's carbonyl groups, lipid's hydroperoxides, activity of glutathione-peroxidase). Study objects were trivalent seasonal influenza vaccine, "Vaxigrip" (Sanofi Pasteur, S.A., France), "Inflexal V" (Biotech Ltd. Berne, Switzerland) and experimental vaccine samples. Highest immunogenicity vaccines had undergone improvements and modifications using adjuvant systems and acylation influenza proteins. Liposomes 2 – the experimental influenza vaccine with a liposome negative charge and antigenic composition like split vaccines "Vaksihryp". Liposomes 2.1 - the adjuvant experimental influenza vaccine with modifications liposomal components (etoniy and chlorophyllipt molecules embedded in liposomal membrane). Liposomes 2.2 - the adjuvant experimental influenza vaccine further modification through acylation antigenic component. **Results and discussion.** Among the vaccines with the antigenic component modification and addition of adjuvants, the highest production of specific influenza antibodies was observed after administration liposomes №2.2 sample, which was made on the basis of antigen Vaxigrip with negatively charged liposomal formulation, the addition of adjuvants and modification antigenic composition, the second ranked liposomes №2.1, without antigenic modification. The study identified regarding the frequency of local reactions, assessed by visual observations, among experimental animals in injection site after legalized vaccines or newly samples weren't characterized by the formation of swelling, hardening of tissue hyperemia or painful local reactions throughout the observation time. Experimental mice also haven't fever for the 5 days after manipulation, which is the main criterion of systemic adverse reactions after they administered vaccine preparations. Also after use of experimental drugs and drug comparison, subjective, wasn't happened abnormalities in general condition animals, including a decrease in appetite, digestive disorders, changes in activity and more. These observations, however, do not allow to conclude the complete safety newly created experimental vaccine and require additional evaluation tests. As base component for building experimental liposomal vaccine used the fosfatydilholin (FH). FH is a substrate for activation lipid peroxidation. Lecithin liposomes, that are liposomal vaccine structural and functional components, are exposed to a variety number of physical and chemical factors. One of biochemical events, that happen to them, are lipid peroxidation, accompanied by free radicals appearance in the system and, ultimately, causes phospholipid bi-layer membranes degradation by a violation of their permeability and lysis. In this regard, system safety control and liposomal drug efficacy should include the definition the content lipid peroxidation products. **Conclusion.** Thus, experimental samples influenza liposomal vaccine (without modification and with its for liposomal and antigenic

components) haven't found increased levels primary products lipid peroxidation – lipid hydro peroxides and protein oxidation products – carbonyl protein and haven't significant effects inhibition anti-oxidant enzymes in rat's serum. More results the study stage the safety most effective vaccine samples will be present in the text.

Keywords: influenza, liposomal vaccine, safety, adjuvants