

4. Использование иммуномодуляторов в бройлерном птицеводстве / А. П. Дуктов [и др.] – Тюмень: ГАУ Северного Зауралья, 2021. 352 с. Леваньков С.В. Адсорбционные свойства хитозана по отношению к белковым веществам / С.В. Леваньков, Е.В. Якуш //Известия ТИПРО (Тихоокеанского научно-исследовательского рыбохозяйственного центра). 2001. Т. 129. С. 121-128.
5. Области применения хитозана / Г.Г. Няникова [и др.] // Известия Санкт-Петербургского государственного технологического института (технического университета). 2007. №. 2. С. 20–26.
6. Перспективы использования хитозана как стабилизатора при коллоидных помутнениях / Трусова М. М., Камедько Т. Н., Павлова О. В. // Пищевая промышленность: наука и технологии. Т. 14, №. 4. С. 97–102.
7. Практические аспекты применения хитозана и его производных в различных областях народного хозяйства / М.А. Фролова [и др.], Изд-во ВНИРО/VNIRO Publishing.
8. Прикладные аспекты иммуномодуляции с использованием средств природного происхождения / П. А. Красочко [и др.] Краснодар: КубГАУ, 2021. 398 с.
9. Сорбционная способность различных модификаций хитозана в отношении регламентируемых микотоксинов / П.А. Красочко [и др.] // Известия Уфимского научного центра РАН. 2016. № 3–1. С. 124–127.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ХИТОЗАНА В КАЧЕСТВЕ АДЬЮВАНТА ПРИ ПРОИЗВОДСТВЕ ВАКЦИННЫХ ПРЕПАРАТОВ

**А.И. Албулов¹, М.А. Фролова¹, П.А. Красочко²,
П.П. Красочко², А.В. Гринь¹, А.К. Елисеев¹**

¹ *Всероссийский научно-исследовательский и технологический институт
биологической промышленности, Щелково, Московская область*

² *Учреждение образования «Витебская государственная академия ветеринарной
медицины», Витебск, Республика Беларусь
E-mail: info@bioprogress.ru*

Аннотация. Исследована возможность использования хитозана в качестве адьюванта в составе вакцинных препаратов. Установлено, что сукцинат и низкомолекулярная форма хитозана позволяют получать иммунный ответ на вводимые антигены на уровне или выше известных масляных и сорбционных адьювантов. Наибольшей адьювантной активностью по отношению к ротавирусу обладали хитозан низкомолекулярный и его солевая форма глутамат, титры антител к E-sol1 после использования в составе колибактериозной вакцины различных хитозановых адьювантов были самыми высокими с сукцинатом хитозана и низкомолекулярным хитозаном (мм 80 кДа, СДА 87 %).

Ключевые слова: адьювант, вакцина, сукцинат хитозана, глутамат хитозана, альбумин, ротавирусы, колибактерии.

Введение

В последние десятилетия все более востребованным становится применение хитозана в медицине и ветеринарии. С учетом экономической составляющей выбор адъюванта для ветеринарных вакцин существенно сокращается. За счет высокомолекулярной структуры хитозан способен удерживать антигены внутри полимера, а низкая скорость его расщепления обуславливает длительное присутствие антигена в месте введения [1]. Были продемонстрированы адъювантные свойства различных форм хитозана в составе вакцин при мукозальном, парентеральном и интраназальном применении [2–6]. В связи со сложностью и дороговизной работ с вакцинными антигенами изучение иммунного ответа часто проводят на моделях протеиновых вакцин. Было отмечено усиление иммунного ответа после введения крысам хитозана и глутамата хитозана с очищенным яичным альбумином [7]. В наших исследованиях для этих целей был применен бычий сывороточный альбумин – БСА.

Материалы и методы исследований

В опытах использовали препараты хитозана производства ООО «Биопрогресс»: хитозан высокомолекулярный и низкомолекулярный, сукцинат и глутамат хитозана. Определение адъювантных свойств хитозанов на модели БСА проводили забуференным физраствором с 2 % сукцинатом хитозана. В растворе БСА фирмы Sigma содержание белка довели до 5 мг/мл.

Для сравнения использовали такие адъюванты как гидроокись алюминия (ГОА), квасцы, масляный адъювант ПЭС, неполный адъювант Фрэйнда. Их концентрации в смеси с БСА устанавливали, исходя из используемых в вакцинном производстве.

Опыты проводили на белых лабораторных мышах массой 20–25 г по 20 животных в группе, включая контрольную. Смеси адъювантов с БСА инъецировали по 100 мкл подкожно дважды с интервалом в 21 день, после чего в сыворотке крови с помощью ИФА определяли уровень антител к БСА.

Результаты исследований

Данные, приведенные в табл. 1, показывают, что наиболее высокие уровни антител к БСА были получены после первого и второго введения животным смеси альбумина с сукцинатом хитозана.

Таблица 1

Уровень антител в сыворотках крови мышей к БСА в реакции ИФА при использовании различных адъювантов

№ п/п	Вид адъюванта	Концентрация адъюванта, %	Значения уровня антител к БСА в МЕ через 21 день	
			после 1-й инъекции	
1	Без адъюванта	0	11,2+3,2	1.
2	Неполный адъювант	50,0	21,3+18,1	2.
3	ПЭС (масло)	50,0	22,4+19,6	3.
4	ГОА	1,5	28,7+21,1	4.
5	Сукцинат	0,25	45,1 ±4,0	5.

В сыворотке животных, которым вводили БСА без адьюванта и с хитозаном, отмечался незначительный разброс уровней антител. В группах мышей, которым инъецировали препараты с ГОА, масляным адьювантом ПЭС и неполным адьювантом Фрэйнда, наблюдался очень большой разброс уровней антител, что отрицательно сказывалось на общей напряженности гуморального иммунитета в группе. Недостатком ГОА и масляных адьювантов является также выраженная местная воспалительная реакция, переходящая зачастую в процесс инкапсулирования и изъязвления места введения, что приводит к снижению ожидаемого эффекта.

На следующем этапе для проверки адьювантных свойств хитозана вместо альбумина использовали антигены инактивированных вакцин против ротавирусной инфекции и колибактериоза. Накопление ротавирусов проводили на культуре клеток СПЭВ в среде Игла до титра 7,0 Ig ТЦЦ 50/мл, эшерихии культивировали на мясо-пептонном агаре до титра микробных тел 5 млрд/мл. После инактивации теотропином в культуральные жидкости с антигенами вносили хитозан различных препаративных форм до конечной концентрации 0,25 %, тщательно перемешивали и вводили внутримышечно белым крысам в дозе 0,5 мл. Через 7 дней животных тотально обескровливали и в сыворотках крови определяли наличие антител к ротавирусу в РИГА к эшерихиям – в РА. Для контроля использованы алюмокалиевые квасцы в общепринятой концентрации.

В табл. 2 приведены результаты определения титров антител к ротавирусной инфекции после введения подопытным животным хитозанов различного качества.

Таблица 2

Титры антител к ротавирусу у крыс после использования различных адьювантов

№ п/п	Адьювант	Титр антител к ротавирусу	
		Геометрический	Log ₂
1	Хитозан глутамат	1:16	1.
2	Хитозан сукцинат	1:8	2.
3	Хитозан высокомолекулярный ММ 495, СДА 81%	1:8	3.
4	Хитозан низкомолекулярный ММ 80, СДА 87%	1:16	4.
5	Антиген (без адьювантов)	1:8	5.
6	Алюмокалиевые квасцы	1:4	6.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что наибольшей адьювантной активностью по отношению к ротавирусу обладали хитозан низкомолекулярный и его солевая форма-глутамат.

Из таблицы 3 видно, что титры антител к E-coli после использования в составе колибактериозной вакцины различных хитозановых адьювантов были самыми высокими с сукцинатом хитозана и низкомолекулярным хитозаном (ММ – 80 кДа, СДА – 87 %).

Титры антител к эшерихиям у крыс после использования различных адъювантов

№ п/п	Адъювант	Титр антител к <i>E. coli</i> к 88		Титр антител к <i>E. coli</i> A20	
		геометрический	Log ₂	геометрический	Log ₂
1	2	3	4	5	6
1	Хитозан глютамат	1:32	5,0	1:64	6,0
2	Хитозан сукцинат	1:32	5,0	1:128	7,0
3	Хитозан высокомолекулярный ММ 495, СДА 81%	1:32	5,0	1:32	5,0
4	Хитозан низкомолекулярный ММ 80, СДА 87%	1:128	7,0	1:256	8,0
5	Антиген (без адъювантов)	1:8	3,0	1:2	1,07
6	Алюмокалиевые квасцы	1:64	6,0	1:128	7,0

Алюмокалиевые квасцы показали низкую адъювантную активность к вирусному антигену и высокую — к бактериальному, однако сильная местная воспалительная реакция, образование язв и некрозов делают их применение нецелесообразным.

Заключение

Полученные результаты демонстрируют, что использование сукцината и низкомолекулярной формы хитозана в качестве адъюванта позволяет получать иммунный ответ на вводимые антигены на уровне или выше известных масляных и сорбционных адъювантов, что указывает на перспективность исследований в этом направлении. Проявленные свойства хитозана позволяют предложить этот препарат в качестве адъюванта в производстве отечественных вакцинных препаратов.

Список литературы

1. Хитин и хитозан: Получение, свойства и применение. М.: Наук, 2002, 368 с.
2. Гендон Ю.З., Маркушин С.Г., Кривцов Г.Г. и др. Способ повышения иммуногенности инактивированной гриппозной вакцины. Патент № 2323742 РФ.
3. Borges O., Silva M., de Sousa A. et al. Alginate coated chitosan nanoparticles are an effective subcutaneous adjuvant for hepatitis B surface anti-gen // *Int. Immunopharmacol.* 2008. Vol. 8. P. 1773–1780.
4. Ghendon Y., Markushin S., Krivtsov G., Akopova I. Chitosan as an adjuvant for parenterally administered inactivated influenza vaccines // *Arch. Virol.* 2008. Vol. 153. P. 831–837.
5. Pium L., Jabbal-Gill I., Hinchcliffe M. et al. Chitosan as a novel nasal delivery system for vaccines // *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2001. Vol. 51. P. 81–96. Pium L. Nasal drug delivery – possibilities, problems and solutions // *J. Control Release.* 2003. Vol. 87. P. 187–198.
6. Kang M.L., Cho C.S., Yoo H.S. Application of chitosan microspheres for nasal delivery of vaccines // *Biotechnol. Adv.* 2009. Vol. 27. P. 857–865.
7. Hefferman M.Y., Zaharoff D.A., Fallon Y.K., Schlom Y., Greiner Y.W. *In vivo* efficacy of chitosan/il-12 adjuvant system for protein based vaccines // *Biomaterials.* 2011. Vol. 32. P. 926–932.