

УДК 256-344.75.789-64

## ОЦЕНКА МОРФОЛОГИЧЕСКИХ ИЗМЕНЕНИЙ ТКАНЕЙ ЖИВОТНЫХ ПРИ ВВЕДЕНИИ ВАКЦИН С МАСЛЯНЫМИ АДЪЮВАНТАМИ

\* Красочко П.А., \* Красочко И.А., \*\* Высокоморная О.В.

\*РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского», г. Минск, Республика Беларусь

\*\*УО «Гродненский государственный аграрный университет»

*В статье приведены результаты изучения тканевой реакции у лабораторных животных при введении вакцины с различными масляными адъювантами - Montanide ISA 70, Montanide ISA 15, Montanide ISA 206 и Эмульсиген 10%. Установлено, что при использовании адъювантов Эмульсиген 10%, Montanide ISA 15, Montanide ISA 206 в мышечной ткани отмечают наличие некротизированных клеток и интенсивной пролиферации лимфоидных клеток на месте некротического детрита.*

*In the article the results of studying tissue response in laboratory animals with the introduction of the vaccine with different adjuvants-Montanide ISA oil 70, Montanide ISA 15, Montanide ISA 206 and Emul'sigen 10%. Found that when using adjuvants Emul'sigen 10%, Montanide ISA 15, Montanide ISA 206 in muscle tissue have a nekrotizirovannyh cells and intense proliferation of lymphoid cells in Necrotizing detritus.*

**Введение.** В современных условиях при конструировании инактивированных вакцин обязательным компонентом должны быть адъюванты, так как инактивированные вирусы в чистом виде обладают низкой иммунологической активностью. Иммуногенность вакцин зависит не только от количества и качества антигена, способа применения и технологии изготовления препарата, но и от правильного выбора неспецифических стимуляторов иммунитета – адъювантов.

Преимущества использования адъювантов в композициях вакцин включают их способность: направлять и оптимизировать иммунный ответ, ускорять опосредованные клетками реакции, усиливать иммуногенные свойства слабых иммунных компонентов, совершенствовать качество вакцин и их эффективность в тех случаях, когда иммунные ответы реципиентов ослаблены [6].

Выбор адъювантов для вакцины должен быть основан на анализе потенциального преимущества адъюванта для усиления иммуногенности вакцины, соотношенного с риском индуцирования местных и системных реакций [8].

Инактивированные вакцины на основе масляных адъювантов широко используются для профилактики ряда инфекционных болезней животных уже долгое время. Эти адъюванты способствуют формированию напряженного и продолжительного иммунитета. Современные инактивированные эмульсионные вакцины представляют собой иммунобиологические препараты, содержащие в большой концентрации цельные вирусы или бактерии в комбинации с масляным адъювантом, в большинстве случаев формирующим эмульсию обратного типа («вода-масло») [1, 2].

Механизм их действия заключается в эмульгировании антигена в масляную оболочку путем образования «эмульсионного шарика». Для усиления иммунного ответа антиген должен находиться внутри капель воды, диспергированных в липидной фазе. Эмульсии освобождают антиген в течение более длительного времени, чем сорбированные вакцины, что может объяснить более напряженный и длительный иммунитет организма на вводимый антигенный компонент [7].

Общим недостатком эмульсионных вакцин на основе обратной эмульсии является их относительно высокая вязкость и сильная тканевая реакция в точке введения, которая может проявиться отеком, развитием хронического воспаления, инкапсулированием вакцины [3, 4, 5].

Компаниями MVP Laboratories, Inc. и Sepic были разработаны новые серии адъювантов – эмульсиген (Emulsigen) и ИЗА. Данные адъюванты представляют собой молочно-белую эмульсию типа масло в воде, предназначенную для смешивания непосредственно с вакцинными антигенами без какой-либо дальнейшей обработки для повышения иммуногенности окончательной вакцины [9].

Однако в доступной нам литературе сведений о клеточной реакции на введение вакцин с масляными адъювантами нами не обнаружено.

**Целью исследования** было изучение тканевой реакции у лабораторных животных при введении вакцины с различными масляными адъювантами.

### Материалы и методы.

В качестве тест-объекта использовали инактивированные теотропином штаммы вируса ИРТ - КМИЭВ 7 (титр вируса 7,0 Ig ТЦД 50/мл) и Proteus mirabilis - КМИЭВ 44 (концентрация 2,0 млрд. микробных тел в 1 мл). Для изучения влияния вакцины на ткань использовали следующие масляные адъюванты: Эмульсиген (10%), Montanid ISA 15 (15%), Montanid ISA 70 (70%), Montanid ISA 206 (50%).

Для изучения тканевой реакции после вакцинации использовали лабораторных животных – белых крыс. Животных разделили на 5 групп по 4 головы в группе и обработали вирусно-бактериальной вакциной (ИРТ + Proteus Mirabilis) с разными адъювантами. Крысам первой опытной группы вводили внутримышечно по 1,0 мл вирусно-бактериальной вакцины с адъювантом Эмульсиген; крысам второй опытной группы вводили вакцину с адъювантом Montanid ISA 15, крысам третьей опытной группы вводили вакцину с адъювантом Montanid ISA 70, крысам четвертой опытной группы вводили вакцину с адъювантом Montanid ISA 206, крысы пятой опытной группы – контроль.

Отбор тканей для гистологического исследования осуществлялся на 3 и 7 день после введения вакцины. Для фиксации материала использовался 10% нейтральный формалин.

Обработка фиксированных тканей осуществлялась по следующей методике:

1. После фиксации тканей в формалине осуществляли промывку в проточной воде. Кусочки тканей (размер 1x1x0,5) оборачивали в марлю, которую крепили к краю сосуда. На водопроводный кран надевали резиновую трубку, конец которой опускали в сосуд с образцами тканей. Промывку осуществляли в течение 24 часов.

Таблица 40

**После промывки образцы тканей проходили обезвоживание:**

№ п/п	Реагент	Время, мин
1	Ацетон	30
2	Ацетон	30
3	Ацетон	30
4	Ацетон	30
5	Уайт-спирит	60
6	Уайт-спирит	60
7	Уайт-спирит	60

3. Для получения тонких гистологических срезов фиксированный и промытый материал заливали в плотную среду, предварительно пропитав ею кусочки тканей. В данном случае использовался парафин.

8	Парафин 56°С	60
9	Парафин 56°С	60
10	Парафин 56°С	60
11	Парафин 56°С	60

Для изготовления срезов использовали микротом. Полученные срезы при помощи мягкой кисточки (слегка смоченной водой) или препаровальной иглы снимали с ножа и переносили на обезжиренные предметные стекла и приклеивали белковым клеем. Для расправления срезы переносили в емкость (чашку, бобовидный тазик) с теплой (46-48°С) дистиллированной водой и расправляли. Окрашивание проводится с целью оптической дифференцировки структурных элементов тканей. Срезы окрашивали гематоксилин-эозином. Этот метод позволяет не только определить наличие патологических изменений, но и ориентировать на необходимость применения других дополнительных методов для окончательного установления диагноза.

**Окраску гистосрезов проводили в следующем порядке:**

- депарафинирование (ксилол – 3 порции, спирт 100°, 96°, 70°, вода дистиллированная – 2 порции) по 2 минуты в каждом растворе;
- промывка в водопроводной воде 60-90 секунд;
- дифференцировка в солянокислом спирте (1 -процентный раствор соляной кислоты в 70° спирте) до появления розового цвета срезов (30-60 секунд);
- промывка в водопроводной воде (лучше в двух порциях) 3-5-10 минут до посинения срезов;
- окраска раствором эозина – 2-5- минут;
- промывка в дистиллированной воде 40-60 секунд;
- обезвоживание в спиртах возрастающей крепости (70°, 96°, 100°) по 1 минуте;
- просветление гистосрезов в карбол-ксилоле 2 минуты;
- окрашенные гистосрезы переносят в ксилол на 1-2 минут, после чего заключают в бальзам.

Для просветления срезов используют карбол-ксилол в соотношении 1:4-1:10 (по объему). Для заключения срезов под покровное стекло применяли пихтовый бальзам.

При заключении срезов каплю бальзама наносили на предметное стекло под углом 45°С. Когда бальзам растечется по краю, плавно его опускали на срез, поддерживая противоположный край иглой. Излишки бальзама удаляли со стекла салфеткой или тряпочкой, слегка смоченной ксилолом. Препарат клали на планшет горизонтально на 24-48 часов, желательно под груз. При этом методе окраски ядра клеток лиловые или синие; цитоплазма – красного цвета различного тона, соединительная ткань – светлорозового цвета.

Просмотр и оценку гистоизменений проводили под микроскопом «Олимпус» с теленасадкой.

**Результаты исследований.**

В результате проведенных исследований при внутримышечном введении вакцины с различными адьювантами не отмечено гибели животных, на месте введения была небольшая припухлость и болезненность в первые дни после инъекции.

При проведении гистоисследований установлено следующее.

У крыс контрольной группы мышечная ткань была без инфильтрации, мышечные волокна ровные, без признаков воспаления (рис.1).

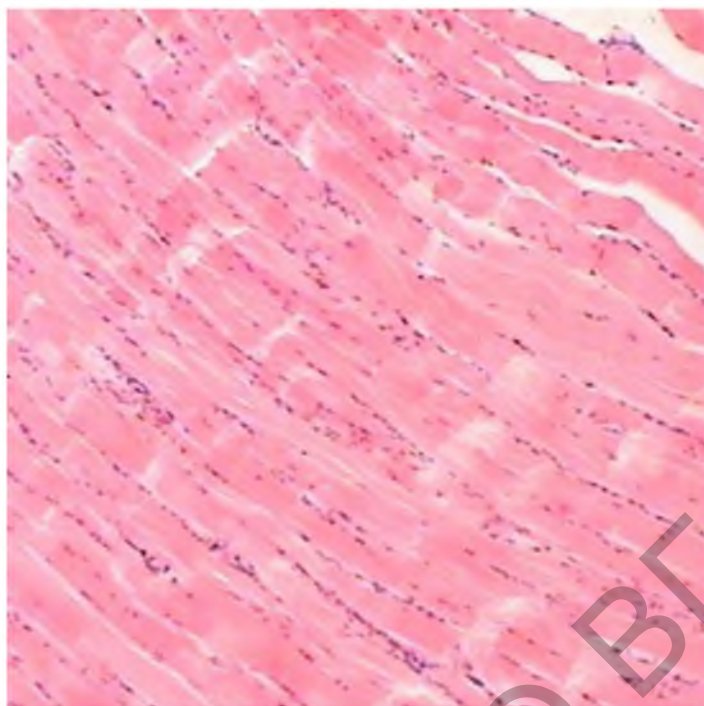


Рис. 11. Мышечная ткань у крыс контрольной группы.

У крыс, которым вводилась вакцина, в мышечной ткани имелись изменения различной степени. При изучении влияния вакцины с адъювантом *Montanide ISA 206* получены следующие результаты, приведенные на рис. 2-7.



Рис. 12. Слабые пролифераты лимфоидных клеток в интерстиции

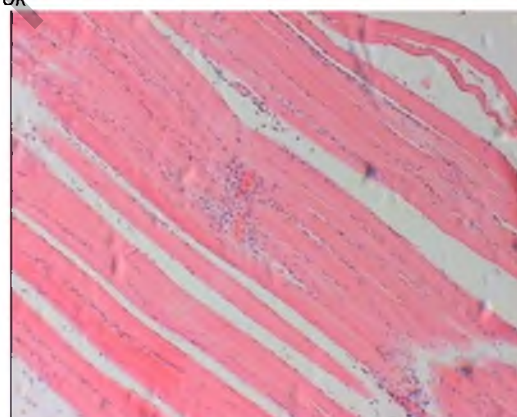


Рис. 13. Слабые пролифераты лимфоидных клеток в интерстиции, фрагментация мышечных волокон

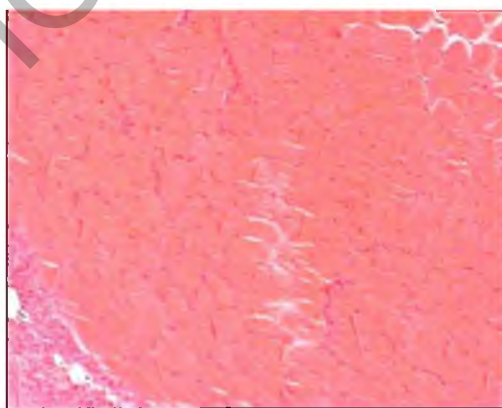


Рис. 14. Лимфоидный пролиферат по периферии мышцы, слабая пролиферация в интерстиции

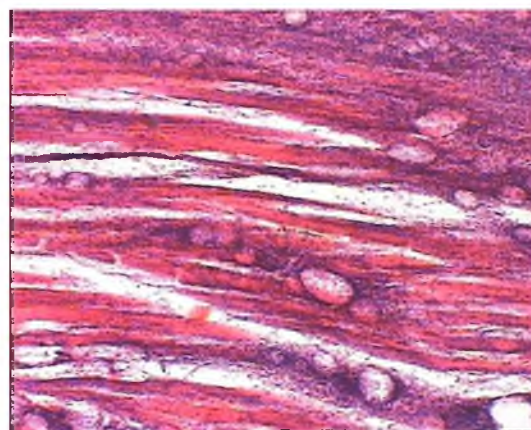
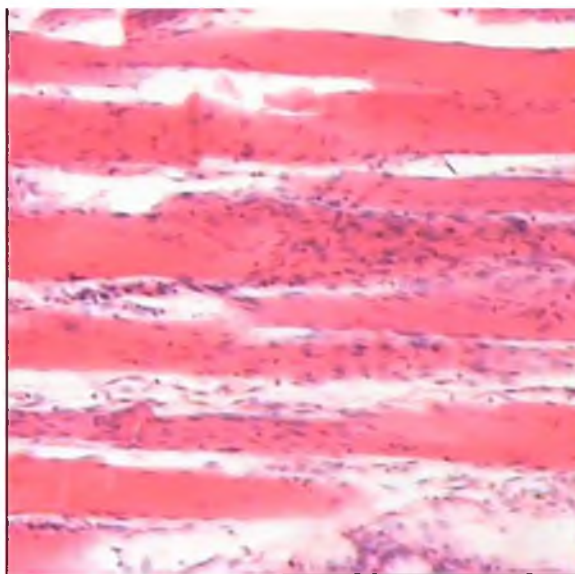


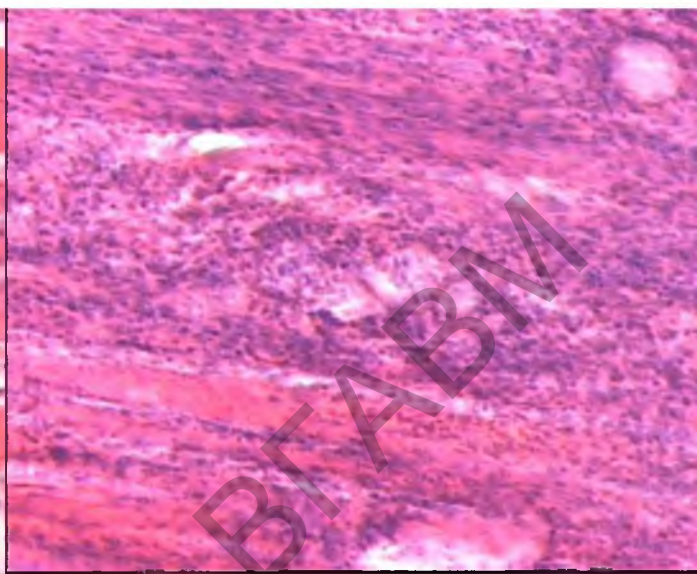
Рис. 15. Интенсивные лимфоидные пролифераты с некрозом мышечных волокон

7 сутки



(X100)

Рис. 16. Фрагментация мышечных волокон, разрастание соединительной ткани



(X100)

Рис. 17. Некроз мышечных волокон, замещение пролифератами лимфоидных клеток некротизированной массы

Из микрофотографий видно, что через 3 суток после введения вакцины с адъювантом *Montanide ISA 206* в области введения отмечены слабые пролифераты лимфоидных клеток в интерстиции, фрагментация мышечных волокон. Имеются также интенсивные лимфоидные пролифераты с некрозом мышечных волокон, лимфоидный пролиферат по периферии мышцы, слабая пролиферация в интерстиции. Через 7 суток на месте инъекции отмечена фрагментация мышечных волокон, разрастание соединительной ткани, а также - некроз мышечных волокон, замещение пролифератами лимфоидных клеток некротизированной ткани.

При изучении влияния вакцины с адъювантом *Montanide ISA 15* получены следующие результаты, приведенные на рис. 8-13.

3 суток

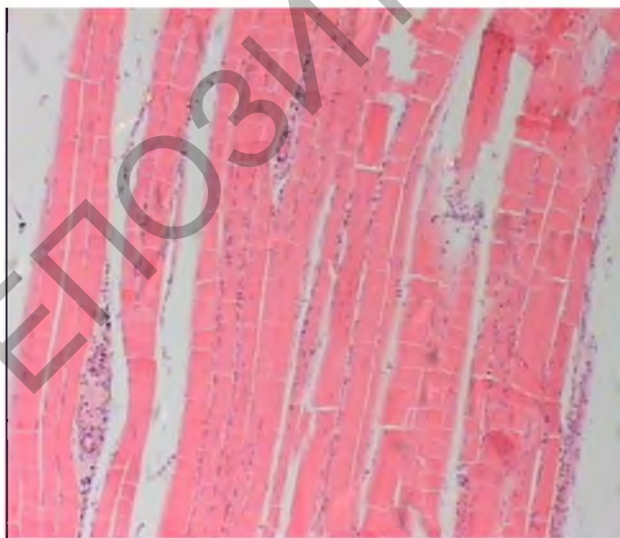


Рис. 18. Отек и фрагментация мышечных волокон, слабая лимфоидно-макрофагальная пролиферация

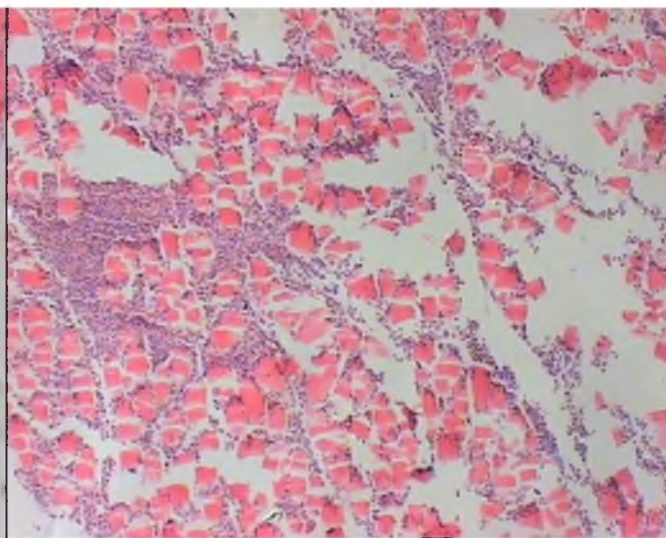


Рис. 19. Отек и некротизация мышечных волокон, интенсивная лимфоидно-макрофагальная пролиферация

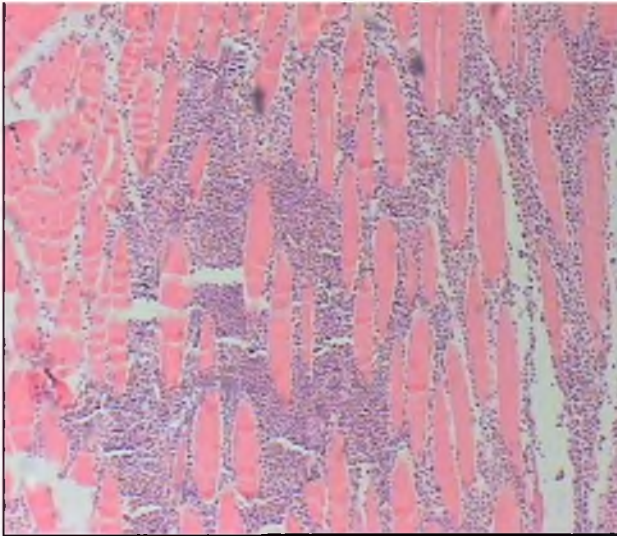


Рис. 20. Некротизация мышечных волокон, интенсивная лимфоидно-макрофагальная пролиферация

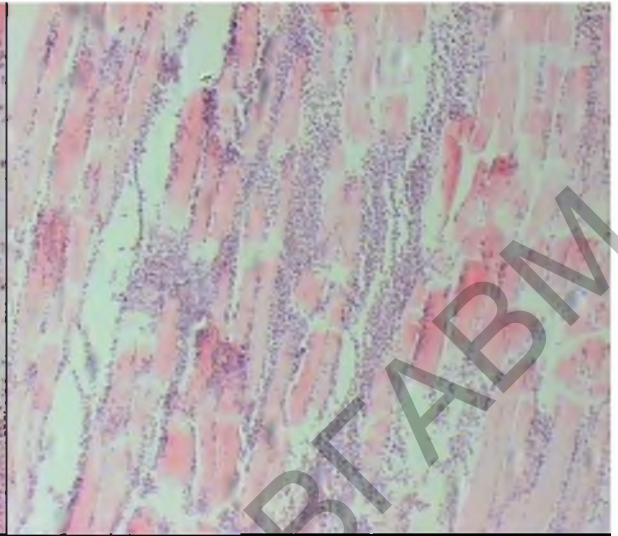


Рис. 21. Некротизация мышечных волокон, интенсивная лимфоидно-макрофагальная пролиферация в интерстиции

7 суток

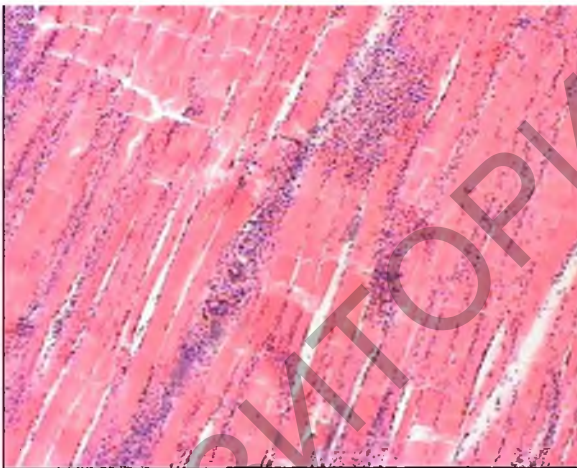


Рис. 22. Умеренная лимфоидно-макрофагальная пролиферация в интерстиции, фрагментация мышечных волокон

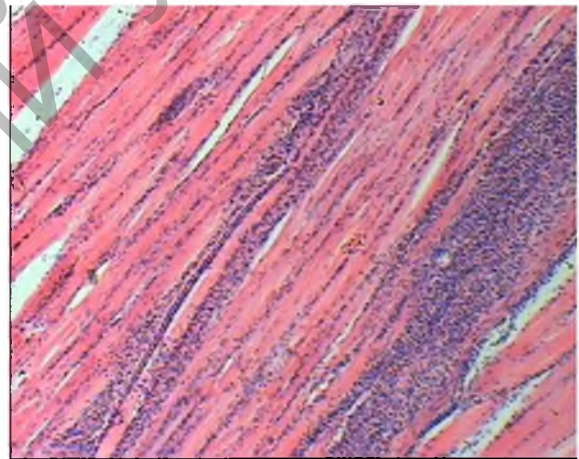


Рис. 23. Интенсивная лимфоидно-макрофагальная пролиферация

Из микрофотографий видно, что через 3 суток после введения вакцины с адъювантом *Montanide ISA 15* на месте введения отмечены отек и фрагментация мышечных волокон, слабая лимфоидно-макрофагальная пролиферация. На отдельных гистосрезках - отек и некротизация мышечных волокон, интенсивная лимфоидно-макрофагальная пролиферация. Кроме того, имеется некротизация мышечных волокон, интенсивная лимфоидно-макрофагальная пролиферация в интерстиции. Через 7 суток на месте инъекции отмечена умеренная лимфоидно-макрофагальная пролиферация в интерстиции, фрагментация мышечных волокон, а также интенсивная лимфоидно-макрофагальная пролиферация.

При изучении влияния вакцины с адъювантом *Montanide ISA 70* получены следующие результаты, приведенные на рис. 14-19.

3 суток

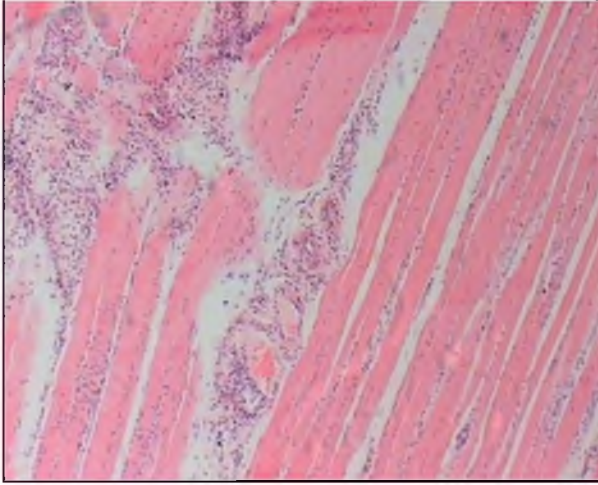


Рис. 24. Отек интерстиции, умеренная пролиферация лимфоидно-макрофагальных клеток и разрастание соединительной ткани в интерстиции

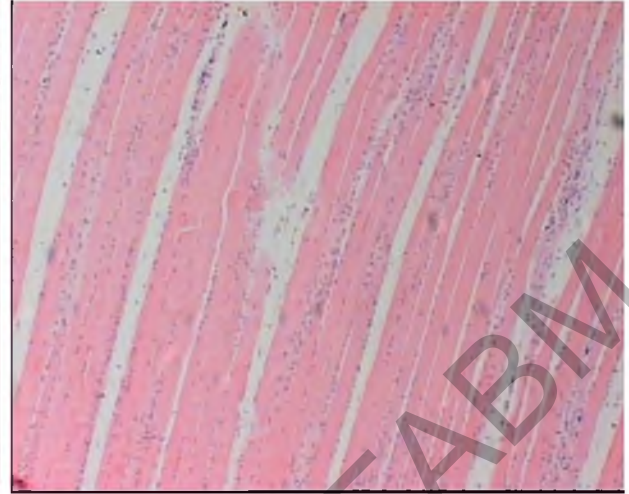


Рис. 25. Слабые пролифераты в интерстиции мышцы

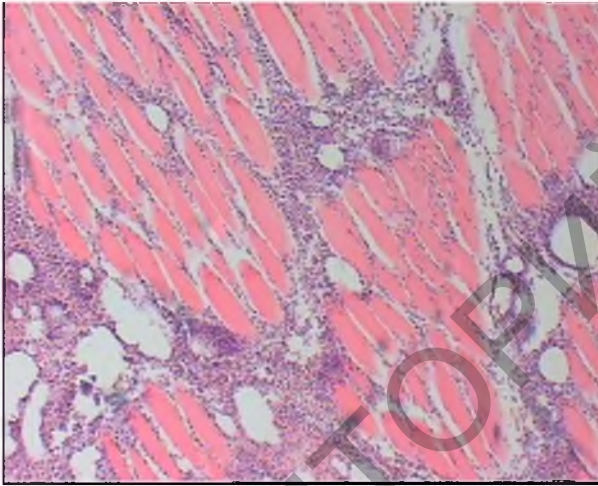


Рис.26. Крупные пролифераты в интерстиции мышцы и на месте некротизированных мышечных волокон

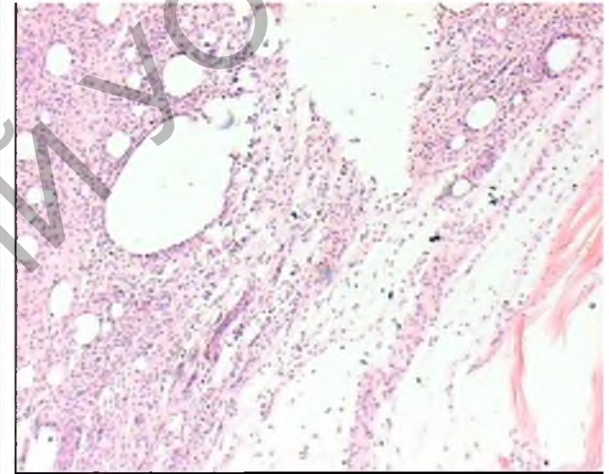


Рис. 27. Крупные пролифераты в интерстиции мышцы и на месте некротизированных мышечных волокон

7 суток

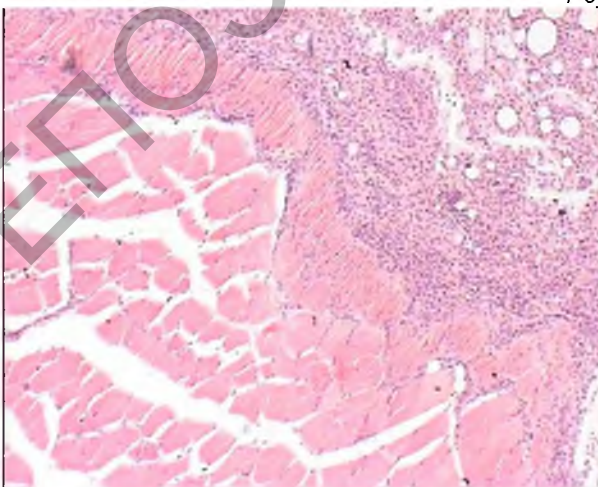


Рис.28. Отек интерстиции, умеренная пролиферация лимфоидно-макрофагальных клеток и разрастание соединительной ткани в интерстиции

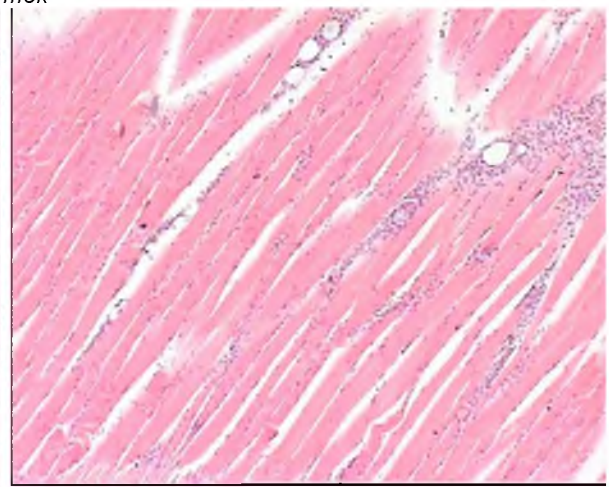


Рис. 29. Слабые пролифераты в интерстиции мышцы

Из микрофотографий видно, что через 3 суток после введения вакцины с адъювантом *Montanide ISA 70* на месте введения отмечены отек интерстиции, умеренная пролиферация лимфоидно-макрофагальных клеток и разрастание соединительной ткани в интерстиции. Имеются слабые пролифераты в интерстиции мышцы и крупные пролифераты в интерстиции мышцы и на месте некротизированных мышечных волокон. Через 7 суток на гистосреззах отмечается отек интерстиции, слабая или умеренная пролиферация лимфоидно-макрофагальных клеток и разрастание соединительной ткани в интерстиции.

При изучении влияния вакцины с адъювантом *Эмульсиген 10%* получены следующие результаты, приведенные на рис. 20-21.

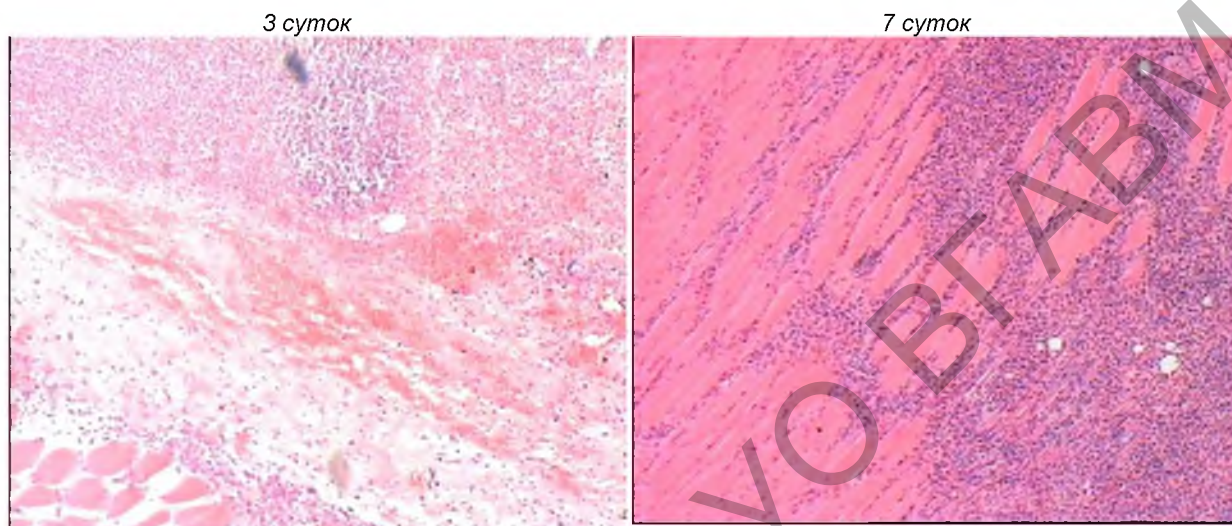


Рис. 30. Некроз мышечных волокон, формирование демаркационного вала, очаговая пролиферация лимфоидных клеток

Рис. 31. Некроз мышечных волокон. Интенсивная пролиферация лимфоидных клеток на месте некротического детрита

Через 3 суток после введения вакцины против инфекционного ринотрахеита и протейной инфекции с адъювантом *Эмульсиген* на месте введения отмечается некроз мышечных волокон, формирование демаркационного вала, очаговая пролиферация лимфоидных клеток, а через 7 суток - некроз мышечных волокон, интенсивная пролиферация лимфоидных клеток на месте некротического детрита.

**Заключение.** Анализ полученных данных свидетельствует, что при использовании масляных адъювантов *Montanide ISA 70*, *Montanide ISA 15*, *Montanide ISA 206* и *Эмульсиген 10%* на месте введения имеются существенные патологические изменения. Это особенно отмечается при использовании адъювантов *Эмульсиген 10%*, *Montanide ISA 15*, *Montanide ISA 206*. При этом в мышечной ткани отмечают наличие некротизированных клеток и интенсивной пролиферации лимфоидных клеток на месте некротического детрита.

**Литература.** 1. Бомфорд, Р. Адъюванты / Р. Бомфорд // Биотехнол. клеток животных. - М., 1989. - Т. 2. - с. 264-280. 2. Bokhout, B. A. The influence of a water-in-oil emulsion on humoral immunity / B. A. Bokhout, A. T. I. Bianchi, Ph. I. van der heijden [et al.] // *Comp. Immunol., Microbiol. And Infect. diseases.* - 1986. - Vol. 9 - № 2-3. - P. 161-168. 3. Мамков, Н. С. Оценка реактогенности компонентов эмульсионных вакцин на белых мышах / Н. С. Мамков, В. Ю. Савельев, А. И. Дудников // *Акт. пробл. вет. вирусол. : тез. докл. научн. конф., посвящен. 30-летию ВНИИИ.* - Владимир, 1988. - ч. 2. - с. 31-33. 4. Самуйленко, А. Я. Оценка реактогенности эмульсаторов в составе эмульсионных вакцин на морских свинках / А. Я. Самуйленко, Н. Д. Скичко, М. В. Большакова [и др.] // *Научн. основы технологии пром. пр-ва вет. биол. препаратов : тез. докл. третьей Всесоюз. конф.* - М., 1987. - с. 34-35. 5. Droual, R. Investigation of problems associated with intramuscular breast injection of oil-adjuvanted killed vaccines in chickens / R. Droual, A. A. Bickford, B. R. Charlton [et al.] // *Avian Diseases.* - 1990. - Vol. 34. - № 2. - P. 473-478. 6. Vaccine adjuvant: it makes difference / K. M. Lima, S. Aparecida dos Santos, J. M. Rodrigues [et al.] // *Vaccine.* - 2004. - Vol. 22, №19. - P. 2374-2379. 7. Красочко, П. А. Подбор оптимальных адъювантов при конструировании ассоциированной инактивированной вакцины против ротавирусной инфекции и колибактериоза крупного рогатого скота [Текст] / П. А. Красочко, Ю. В. Ломако, Я. П. Яромчик // Актуальные проблемы интенсивного развития животноводства : сборник научных трудов / Министерство сельского хозяйства и продовольствия Республики Беларусь, Главное управление образования, науки и кадров, Учреждение образования "Белорусская государственная сельскохозяйственная академия". - Горки, 2011. - Вып. 14, ч. 2. - С. 244-249. 8. Селиверстов, А.В. Сравнительная оценка масляных адъювантов в составе вакцины против инфекционной бурзальной болезни / Селиверстов А.В., Борисов А.В., Борисов В.В., Долгов Д.Л., Фролов С.В. // *Труды Федерального центра охраны здоровья животных.* - Владимир, 2010; Т. 8. - С. 155-169. 9. Красочко, П. А. Изучение антигенных свойств компонентов вакцины против вирусной диареи, клебсиеллеза, ротавирусной и протейной инфекций крупного рогатого скота с различными адъювантами / Красочко П.А., Борисовец Д.С., Ломако Ю.В., Еремец Н.К. // *Научные основы производства ветеринарных биологических препаратов / Всерос. науч.-исслед. и технол. ин-т биол. пром-сти.* - Щелково, 2009. - С. 253-260

Статья передана в печать 21.09.2012 г.