

Г. Г. КАРАПЕТЯН

К ПОВЫШЕНИЮ ЭФФЕКТИВНОСТИ ПРОТИВОТУБЕРКУЛЕЗНОЙ ВАКЦИНАЦИИ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

Повышение эффективности противотуберкулезной вакцинации имеет громадное значение в спецпрофилактике туберкулеза. Для достижения этой цели высказаны множественные предположения. Они относились как к методу введения вакцины, так и ее дозировке или комбинации вакцины с различными неспецифическими агентами. Так, например, многие авторы находят, что накожный метод вакцинации более эффективен, чем классический метод вакцинации по Кальметту. По мнению других авторов, внутрикожное введение вакцины дает более стойкий и продолжительный иммунитет, чем кальметтский и накожный методы введения. Далее, есть авторы, которые с целью повышения эффективности вакцинации предлагают вакцину вводить через носовую полость в комбинации с накожным или пероральным методом.

А. Ассис [1, 2], Розенберг [8] и др. вводят большое количество вакцины через рот, чем, по их мнению, достигается наиболее устойчивое, благоприятное иммуноаннергическое реактивное состояние.

Была выдвинута идея депонирования бацилл вакцины с целью длительного «наводнения» ими организма, что и вызывает, как полагалось, более длительный и глубокий иммуногенез. Так, В. А. Любарский и А. Ф. Коржинская [4] с этой целью к вакцине БЦЖ добавили ланолин, квасцы и т. д., но особого успеха они не достигли. Рамон и Целлер (Ramon G. et Zeller [15]) в 1926 г., с целью депонирования бацилл вакцины, применили гидроксиалюминий в качестве адсорбента. Такой же опыт был повторен спустя 20 лет Манном и Шпинком (Mann L., Spinka J., цитата по Макаревич Н.), но как в первый, так и во второй раз эксперименты не дали ожидаемого результата.

В последние годы в СССР Н. М. Макаревич [5, 6] впервые в эксперименте применил гидроксиалюминий в качестве адсорбента при вакцинации БЦЖ. По данным автора, как поствакцинальная аллергия, так и высеваемость бацилл из органов животных, иммунизированных таким способом, имеют большую продолжительность, чем у животных, вакцинированных одной вакциной БЦЖ.

Далее автор указывает на повышение иммунологической эффективности при такой комбинированной форме вакцинации. Но у этих животных на месте введения вакцины с адсорбентом в ряде случаев возникали инфильтраты с последующим нагноением, которое держалось до 4—5, а иногда до 8 мес.

Мы полагаем, что с биологической точки зрения подобная постановка вопроса методически неверна. Разрешение проблемы вакцинации в смысле повышения ее эффективности нельзя искать в чисто механической комбинации вакцины с адсорбентом. Действительно, при попытке воздействия на иммунологическую реактивность организма в этой методике не учтены ни новые физико-химические качества в прошлом вирулентных, а в настоящем авирулентных бацилл БЦЖ, ни физиологические функции и свойства барьерных систем макроорганизма.

Известно, что вакцина БЦЖ не удовлетворяет предъявленных ей требований как в смысле эффективности, так и продолжительности вызванного ею иммунитета.

Одним из существенных недостатков вакцины БЦЖ, как аттенуированной (авирулентной) культуры, является ее малоинвазионность, что резко снижает ее проникающую и распространяющую способность. А в организме такой маломощной инвазионной способности бацилл противостоит мощная физиологическая система соединительной ткани—межклеточная аморфная субстанция организма, несущая барьерную функцию.

Установлено, что в эмбриональном периоде прежде всех тканей и органов возникает аморфное вещество соединительно-тканного происхождения, имеющее вязкую консистенцию. Это вещество, удачно названное «межклеточным цементом», впоследствии заполняет межклеточное пространство, входит в состав оболочек клеток и стенок капилляров.

Межклеточное аморфное вещество, будучи аргирофильной природы, осуществляет большую обменную и защитную функцию. Доказано, что через него поступают питательные вещества и удаляются метаболиты тканей. Далее выяснилось, что оно, как органический активный барьер, препятствует внедрению вглубь тканей всяких бактерий и их токсинов.

В 1929 г. Дюран Рейнальсом (Duran Reynals [12, 13]) в метаболитах различных микроорганизмов был открыт специальный фактор, разжижающий (дезагрегация) указанное межклеточное вязкое вещество.

При наступлении такой реакции микробы и их токсины получают возможность проникать вглубь тканей. Автором этот фактор был назван «фактором распространения». В 1934 г. Мейер и Пальмер (Meyer K. a. Palmer [14]), исходя из того, что этот фактор подвергает гидролизу гиалуроновую кислоту, снимая ее вязкость, отвели его к ряду ферментов, назвав гиалуронидазой.

Впоследствии выяснилось, что фактор распространения (гиалуронидаза) имеется в достаточном количестве не только в метаболитах многих микробов, но и в различных органах млекопитающих (в коже, легких, печени и т. д.). Чейн и Дьюти (Chain K. a. Duthie E. [11]) в большом количестве его обнаружили в тестикулах человека, быка, кролика и других животных.

Однако, этого фактора не удалось обнаружить в чистой культуре туберкулезных микобактерий (Дюран Рейнальс, Б. Н. Могильницкий [7], П. В. Шехотин [10]). Далее выяснилось, что при прибавлении фермента

гиалуронидаза резко возрастает инвазионная способность бактерий, не выделяющих фактор распространения или мало выделяющих его.

Учитывая вышеуказанные свойства фермента гиалуронидазы и резко ослабленную инвазионную способность бацилл БЦЖ, В. И. Кудрявцева при вакцинации морских свинок к вакцине БЦЖ добавляла тестикулярный экстракт, как фактор, содержащий в себе в большом количестве гиалуронидазу с последующим заражением этих животных 0,02 мг вирулентной культуры тубмикобактерий.

По данным автора, из 16 таких животных туберкулезные изменения были обнаружены только у 5. При введении смеси вакцины и тестикулярного экстракта внутрикожно у всех свинок на месте введения образовался некроз ткани, что методику делает менее перспективной.

Аналогичный эффект был получен при такой комбинированной вакцинации белых мышей и морских свинок (М. В. Триус, Т. Н. Ященко [9]).

Для подтверждения полученных данных этих авторов, а также с целью некоторого изменения методики введения тестикулярного экстракта и дозировки тубмикобактерий, мы ставили аналогичный опыт на кроликах.

Так, если указанные авторы фермент вводили совместно с вакциной, что в ряде случаев приводило к изъязвлению, то мы его ввели внутривенно и подобного рода осложнения не обнаружили. Что касается дозировки тубмикобактерий, мы ее повысили от 3 до 3000 раз по сравнению с тем количеством, которое было применено В. И. Кудрявцевой [3], М. В. Триус, Т. Н. Ященко. Такая модификация, на наш взгляд, дает более точное представление о роли гиалуронидазы в процессе иммуногенеза организма. Прежде чем приступить к основному опыту, необходимо было проверить биологическую активность тестикулярного экстракта в смысле повышения проницаемости барьерных систем.

Экстракт мы приготовили из тестикулов только что зарезанного быка. Каждый раз за день до употребления проверялась его способность к гидролизу коллоидно-вартонового студня, приготовленного из пуповины человека, по своим физико-химическим свойствам близкого к аморфному межклеточному вязкому веществу. Проверка производилась вискозиметром Оствальда.

Ввиду аналогичности структур вартонового студня и межклеточного вязкого аморфного вещества, реакция, произведенная *in vitro*, может служить моделью, показывающей ту же самую реакцию *in vivo*.

Проверка воздействия тестикулярного экстракта на барьерную систему животного производилась следующим образом.

10 кроликов, иммунизированных 0,1 мг БЦЖ (подкожно) через 2 мес. были заражены 0,5 мг вирулентной культуры тубмикобактерий. Вследствие иммунизации туберкулезный процесс у животных развивался медленно, т. е. принял сугубо хроническое течение. Через 2 мес. после заражения 5 кроликам внутривенно ввели по 3 мл тестикулярного экстракта. Животные, которые до этого были в удовлетворительном состоянии, ели хорошо и не теряли в весе, после введения экстракта через

7—10 дней становились малоподвижными, ели плохо. Двое из 5 пали через 45—50 дней после введения тестикулярного экстракта. Затем были забиты остальные 8 кроликов. При вскрытии макроскопические картины обеих групп заметно отличались.

Так, из 5 кроликов, вакцинированных и инфицированных, у трех на месте введения инфекции обнаружили увеличенные регионарные лимфоузлы (пахы) с небольшим содержанием казеоза в них. У двух отмечалась только незначительная гиперплазия регионарных лимфоузлов без содержания казеоза. У 5 кроликов, получивших тестикулярный экстракт, отмечалось значительное увеличение регионарных лимфоузлов со сплошным казеозом.

Во внутренних органах кроликов, не получивших тестикулярного экстракта, макроскопически были обнаружены единичные очаги в селезенке, в печени, в легких, без содержания казеоза. Средний индекс поражения для этой подгруппы не превышал 5. У кроликов, получивших тестикулярный экстракт, макроскопическая картина резко отличалась от таковой в предыдущей группе.

Так, здесь все внутренние органы были усеяны туберкулезными очагами, местами сливного характера, что средний индекс поражения подняло до 17—19.

Таким образом, стало очевидным, что введение 3—4 мл тестикулярного экстракта кроликам, хронически больным туберкулезом, подвергнуло дезагрегации (гидролизу) вязкую аморфную межклеточную субстанцию, аналогично гидролизу вартонового студня при проведении его через вискозиметр в присутствии гиалуронидазы. Воздействие тестикулярного экстракта сводилось к разжижению (деагрегации) межклеточного вязкого аморфного вещества и создавалась выраженная патологическая проницаемость тканей и капиллярной системы, т. е. наступало как бы разрушение барьерных систем, вследствие всего этого наступила манифестация инфекции.

Получив уверенность в способности тестикулярного экстракта вызывать феномен распространения, мы приступили ко второй (основной) серии нашего эксперимента.

Для опыта было взято 43 кролика.

15 кроликам I группы внутривенно ввели по 3—4 мл тестикулярного экстракта. Через 30 мин. в правую паховую область (подкожно) животные получили по 0,1 мг вакцины БЦЖ.

15 кроликам II группы внутривенно ввели в таком же количестве того же экстракта. Через 30 мин. они были вакцинированы в такой же дозе. Спустя 24 ч., кролики повторно внутривенно получили в таком же количестве тестикулярный экстракт.

III группа кроликов (10) получила только вакцину БЦЖ (0,1 мг). Через 2 мес. после вакцинации все три группы были заражены вирулентной культурой туберкулезных микобактерий бычьего типа (по 0,5 мг). Для определения вирулентности штамма были заражены еще 3 кролика.

На 58-й день после заражения из этих 3 кроликов 1 пал, тогда на-

чали забивать остальных. Индекс поражения невакцинированных зараженных составлял 19—21.

Другая была пораженность в остальных трех группах. Так, при вскрытии кроликов I группы у 6 из 15 на месте введения инфекции (первичный очаг) был выявлен казеоз, у 2—плотный инфильтрат, регионарные лимфоузлы у 3 кроликов были казеофицированы, у 5 отмечалась гиперплазия без следов казеоза. Во внутренних органах у 4 кроликов удалось обнаружить по 1—3 очагам в легких, по 2—4—в селезенке. По 3—5 очагов в селезенке и по 1—2 очага в легких было обнаружено у 5 кроликов. У 6 кроликов во внутренних органах макроскопически не было обнаружено никаких туберкулезных изменений.

Таким образом, средний индекс поражения в этой группе составлял около 3.

Во II группе тубизменения были еще менее выражены, чем в предыдущей.

Так, первичный очаг, содержащий казеоз, из 15 кроликов был выявлен у 2. В 4 случаях отмечалось небольшое уплотнение, в 3—гиперплазия регионарных лимфоузлов без следов казеоза. Таким образом, у половины кроликов этой группы места введения первичной инфекции и их регионарные лимфоузлы были свободны от явных туберкулезных изменений. Во внутренних органах только у 4 кроликов (2 из них с казеозным первичным очагом) в селезенке и в легких было обнаружено по 3—4 очага. У одного из них в печени было выявлено 2 очага. Как видим, из 15 животных у 11 во внутренних органах туберкулезных изменений не было обнаружено. Средний индекс поражения в этой группе равнялся 2.

У 6 кроликов из 10 (III группа) первичный очаг в той или другой степени содержал казеоз. В регионарных лимфоузлах казеоз был обнаружен у 2 и гиперплазия—у 3. Пораженность внутренних органов была больше, чем в предыдущих двух группах. Средний индекс составлял около 5,2.

При бактериоскопическом исследовании, когда мазки готовились из различных органов, у 2 кроликов из 15 (I группа) и у 1 кролика из II группы (15 жив.) удалось обнаружить туберкулезные микобактерии. В мазках же кроликов III группы (10 животных) туберкулезные бациллы найдены в 2 случаях.

Посредством посева из внутренних органов (он сделан во II и III группах) как во II группе (15 жив.), так и в III группе (10 жив.) рост тубмикобактерий получили у 3.

Полученные нами данные совпадают с данными В. И. Кудрявцевой, М. В. Триус и Т. Н. Яценко, только с той разницей, что доза вирулентного штамма бацилл в нашем эксперименте была до 3000 раз больше.

Обсуждение результатов

Процесс проникновения микроорганизма в глубь ткани, как известно, обуславливается двумя основными моментами: конституциональной

особенностью барьерной системы, т. е. степенью вязкости межклеточной аморфной субстанции и инвазионной способностью микроорганизма. Иными словами, для внедрения микроба в организм он должен иметь инвазионную способность преодолеть нормальное барьерное препятствие, или же при потере или ослаблении инвазионной способности микроба должна быть снижена физиологическая «упругость» (вязкость) барьерной системы. Известно также, что БЦЖ, бывшие вирулентные туберкулезные бактерии, с потерей вирулентности теряют также инвазионную способность. Поэтому введение фермента гиалуронидазы в организм до вакцинации снижает вязкость межклеточного аморфного вещества.

Таким образом, физико-химические изменения среды заменяют потерянную инвазионную способность авирулентных бацилл вакцины, тем самым обеспечивая более глубокое проникновение вакцинных особей в глубь тканей.

Более эффективное иммунологическое действие вакцинации БЦЖ в комбинации с тестикулярным экстрактом объясняется вышеуказанным физико-химическим изменением барьерных систем, вследствие чего углубившиеся бациллы вакцины вызывали более глубокие иммунологические переустройства с последующим значительным повышением резистентности к туберкулезу.

То, что тестикулярный экстракт—гиалуронидаза—действует только на реактивность макроорганизма и сам по себе не содержит ничего иммуногенного, видно из того отрицательного эффекта, когда он у хронически больных туберкулезом животных вызывает галопирование процесса. Таким образом, в зависимости от условий его действие может быть диаметрально противоположным. В одном случае вызванное им физико-химическое изменение может привести к прорыву как естественной, так и приобретенной резистентности, в другом случае оно усиливает иммуногенез.

В ы в о д ы

1. Аналогично фактору распространения, содержащемуся в микробных метаболитах, гиалуронидаза, добытая из тестикулы быка, производит тот же эффект в смысле дезагрегации коллоидно-дисперсного состояния межклеточного вязкого аргирофильного аморфного вещества.

2. Тестикулярный экстракт—гиалуронидаза,—уменьшая вязкость межклеточной аморфной аргирофильной субстанции, создает благоприятные условия для инвазии бактерий.

3. При его введении больным туберкулезом кроликам подрывается иммунологическая реактивность и хронический текущий туберкулез обостряется, индекс поражения поднимается до 19.

4. При однократном введении фермента гиалуронидазы до вакцинации иммунологическая реактивность повышается и при последующем заражении средний индекс поражения не превышает 3,5, тогда как у

вакцинированных без введения фермента и впоследствии инфицированных средний индекс поражения составляет 5,2.

5. При двукратном введении животным гиалуронидазы эффективность вакцинации более повышается, и при заражении индекс поражения не превышает 2.

Республиканский противотуберкулезный
диспансер

Поступило 8.VI.1962

Գ. Գ. ԿԱՐԱՊԵՏՅԱՆ

ԷՔՍՊԵՐԻՄԵՆՏՈՒՄ ՀԱԿԱՏՈՒԲԵՐԿՈՒԼՅՈՋԱՅԻՆ ՎԱԿՑԻՆԱՅԻԱՅԻ
ԷՖԵԿՏԻՎՈՒԹՅԱՆ ԲԱՐՁՐԱՅՄԱՆ ՄԱՍԻՆ

Ա մ փ ո փ ու մ

Կալմետ-Գերենի (ԲՅԺ) բացիլները կորցնելով վիրուլենտ հատկությունները կորցրել են նաև ինվազիոն ունակությունը: Ամենայն հավանականությամբ, այդ շտամի հակատուբերկուլյոզային իմունիտետ առաջացնելու ընդունակության սահմանափակվածության հիմնական պատճառներից մեկը այդ է հանդիսանում: Եթե հնարավորություն ստեղծվի բարձրացնելու ԲՅԺ-ի ինվազիոն ունակությունը, հավանականորեն, կբարձրանա նաև վակցինայի իմունոգեն հատկությունը: Դրան կարելի է հասնել հյուսվածքներում բարձր թափանցիկականություն ստեղծելու միջոցով: Վերջինս հնարավոր է ստանալ «տարածման ֆակտորի» — գիալուրոնիդազայի միջոցով: Ինչպես հայտնի է, այդ ֆերմենտով հարուստ են տեստիկուլյար հյուսվածքները:

Էքսպերիմենտը 2 սերիայից դրվեց 53 ճագարի վրա:

Առաջին սերիայում անհրաժեշտ էր համոզվել «տարածման ֆակտորի» հյուսվածքների թափանցիկականության բարձրացման վրա ունեցած ազդեցության մեջ: Մեր փորձերում օգտագործվել են տեստիկուլյար էքստրակտ՝ պատրաստված ցուլերի ամորձիներից: Այդ նպատակով 10 ճագար վակցինացվել են 0,1 ԲՅԺ-ով և 2 ամիս հետո վարակվել 0,5 մգ վիրուլենտ միկրոբակտերիաներով (տուբերկուլյոզային): Այս կենդանիների մոտ տուբերկուլյոզը ընդունեց խրոնիկ բնույթ: Երկու ամիս անց, 5 ճագարների արվեց 3 մլլ տեստիկուլյար էքստրակտ (ներերակային ճանապարհով): Կենդանիները 7—10 օր հետո սկսեցին զգալիորեն վատանալ: Էքստրակտը մտցնելուց 45—50 օր անց ճագարներից 2-ը ընկան, մնացած 8 ճագարները սպանվեցին: Պարզվեց, որ տեստիկուլյար էքստրակտ ստացած ճագարների մոտ տուբերկուլյոզը ընդունել է միլյար բնույթ: Մնացած 5 ճագարները, որոնք չէին ստացել այդ ֆերմենտը, վարակվածության ինդեքսը չէր անցնում 7-ից:

Երկրորդ սերիայում կային 43 ճագար, որոնցից 15 ճագարի ներերակային մտցվեց 3—4 մլլ. տեստիկուլյար էքստրակտ և 30 ըսպե հետո՝ 0,1 մգ ԲՅԺ: Երկու ամիս անց 25 ճագարներին նույն ձևով արվեց ֆերմենտ և սրբակվեց վակցինա: 24 ժամ հետո ճագարները ստացան նույն քանակությամբ էքստրակտ:

Երրորդ խմբում 10-ը ճագար ենթարկվեցին միայն վակցինացիայի: Երկու ամիս անց՝ բոլոր երեք խմբի ճագարները վարակվեցին 0,5 մգ վիրուսային շտամով: Բացի այդ, վարակվեցին նաև 3 թարմ ճագար՝ կուլտուրայի վիրուսային տուֆները որոշելու համար: 58-րդ օրում ընկավ այս 3-ից մեկը: Այդ ժամանակ սպանվեցին մնացած բոլոր ճագարները:

Հետազոտությունը պարզեց, որ առաջին խմբում վնասվածության ինդեքսը միջին թվով հավասար է 3-ի, երկրորդ խմբում՝ 2-ի: Այս խմբի 7 ճագարների մոտ տուբերկուլյոզային մակրոսկոպիկ երևույթներ չհայտնաբերվեցին: Երրորդ խմբի ճագարների մոտ վնասվածության ինդեքսը միջին թվով կազմում էր 5,2:

Այսպիսով պարզվեց, որ ֆերմենտ գիալուրոնիդազը բարձրացնում է հյուսվածքների թափանցիկությունը, ստեղծում է բարենպաստ պայմաններ Կալմետի բացիլների ինվազիայի համար, որով և զգալիորեն բարձրացնում է նրանց իմունոգեն հատկությունը:

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Ассис А. Пероральное применение вакцины БЦЖ. Проблемы туберкулеза, 1958, 8, 13—26.
2. Ассис А. Пероральное применение вакцины БЦЖ. Современные проблемы туберкулеза, 1958, 2, 75—86.
3. Кудрявцева В. А. Значение фактора распространения в явлениях инфекции и иммунитета. Проблемы туберкулеза, 1953, 4, 3—13.
4. Любарский В. А. и Коржинская А. Ф. О судьбе туберкулезных бацилл в организме. Журнал иммунитета, 1934, 1, 7—13.
5. Макаревич Н. М. Изучение иммуногенности вакцины БЦЖ в комбинации с неспецифическим веществом. В кн.: Труды института, т. IX, Клинические и эксперимент. исследования по туберкулезу. М., 1957, 29—39.
6. Макаревич Н. М. Динамика вегетирования бактерий БЦЖ в организме морских свинок при комбинированной вакцинации с неспецифическим веществом. Там же стр. 40—47.
7. Могиляницкий Б. Н. Роль «фактора распространения» в процессах проницаемости кровеносных капилляров. В кн.: Вопросы проницаемости кровеносных капилляров в патологии. Изд. АМН СССР, 1949, 9—19.
8. Розенберг А. Приживаемость штаммов БЦЖ различного происхождения в организме экспериментальных животных. Проблемы туберкулеза, 1960, 3, 100—105.
9. Триус М. В. и Яценко Т. Н. Опыт использования диффузного фактора (фактор распространения) для усиления иммуногенного действия вакцины БЦЖ в эксперименте. Проблемы туберкулеза, 1953, 4, 13—19.
10. Шехонин В. П. Проницаемость барьерных систем организма и функции активной соединительной ткани. В кн.: Вопросы проницаемости кровеносных капилляров в патологии. Изд. АМН СССР, 1949, 19—25.
11. Chain E. a. Duth'e E. Identity of Hyalurondese and spreanding Factor, Brit. J. Experment. pathol. 1949, 21, 324—338.
12. Du an Reynals F. Exaltation de l'activite du virus vaccinal par les extraits de certains organs.— Compt. red. Soc. de Biol. 1928, 99, 6—16.
13. Duran Reynals F. The Effect Extracts of certain organs from normal and immunized Animals in the infect. power et vaccin virus.— J. Experm. Medictu 1929, 50, 327—336.
14. Meyr K. a. Palmer. J. Polysaecharide of vitreous humor.— J. Biol. chem. 1934 107, 169—634.
15. Ramon G. et Zeller E. Ann. Instit. Pasteur, 1926, 41, 1, 1—10.