УДК 57.042:574:579.66:663.1

ФРАКЦІЙНИЙ СКЛАД ПРАВЦЕВОГО АНАТОКСИНУ ТА ДИФТЕРІЙНОГО ТОКСИНУ ПРОМИСЛОВОГО ВИРОБНИЦТВА

Бабич Є.М.[1], Калініченко С.В.[1], Рябовіл О.В.[2], Рижкова Т.А.[1], Скляр Н.І.[1], Ждамарова Л.А.[1], Білозерський В.І.[1], Плугатор Т.М.[2], Бобирева І.В.[1], Большакова Г.М.[1]

1 - ДУ «ІМІ ім. І.І.Мечникова НАМН України», м. Харків

2 – ПАТ «ФАРМСТАНДАРТ-БІОЛІК», м. Харків

У інфекційній патології значне місце займають так звані токсинемічні захворювання, патогномонічні клінічні прояви яких насамперед обумовлені специфічною дією бактеріальних токсинів. Надзвичайно шкідливими є мікробні екзотоксини білкової природи, такі як правцевий та дифтерійний, що за своєю токсичністю займають друге та третє місця відповідно після найнебезпечнішого ботуліністичного токсину [1-3].

Незважаючи на те, що токсини різних мікробів вивчаються вже більше ста років, знання щодо структури токсинів та механізмів їх дії постійно оновлюються, сприяючи вдосконаленню біотехнологічних процесів отримання імунологічних препаратів [2-4].

Більшість бактеріальних екзотоксинів мають А-В структуру, тобто складаються з двох компонентів - В-субодиниці, яка бере участь у зв'язуванні токсину з рецептором на поверхні клітини хазяїна і відповідає за транспортування токсину усередину клітини, та А-субодиниці, яка проявляє токсичну (ензиматичну) активність у клітині хазяїна [1-5].

Специфічна активність токсинів залежить від окремих ділянок білкової молекули, які отримали назву «активних центрів» [1-3]. Просторова конфігурація та послідовність чергування амінокислот поліпептидного ланцюга визначає можливість взаємодії молекули токсину з інактивуючими речовинами. Модифікаційних змін структури токсинів можливо досягнути генетичним шляхом або хімічним та фізико-хімічним впливом [3, 6].

Незважаючи на широкі можливості сучасних фізико-хімічних методів дослідження, дотепер неможливо достеменно ідентифікувати всі сполуки, що утворюються під час знешкодження токсинів за допомогою формальдегіду. Не існує єдиної аналітичної технології, яка може повністю характеризувати дифтерійний та правцевий анатоксини. Сучасні технології дають можливість тільки обмежено охарактеризувати одну чи декілька властивостей токсинів та анатоксинів: деякі хімічні модифікації, зміни вторинної чи третинної структури білків або пошкодження певних епітопів [7].

Нативні анатоксини містять різні баластні білки та інші антигенні речовини (залишки поживних середовищ, продукти метаболізму мікроорганізмів). Ці баластні речовини часто є повноцінними антигенами та можуть викликати при імунізації утворення неспецифічних, по відношенню до антигену вакцини, антитіл, посилювати реактогенність препаратів та їх сенсибілізуючі властивості. Для зниження реактогенності та сенсибілізації бактеріальні токсини (анатоксини) очищують за допомогою хімічних (осадження солями, органічними розчинниками), фізико-хімічних (обробка сорбентами, електродекантація, іонообмінна хроматографія тощо) і фізичних (ультрафільтрація, гель-фільтрація) методів. Але очищені анатоксини мають недостатню імунологічну ефективність. У зв'язку з цим до них додають речовини (мінеральні сорбенти), які мають виражену ад'ювантну дію. Крім того, вони забезпечують поступове надходження антигену до організму людини за рахунок уповільнення процесів усмоктування. У якості сорбентів біологічних препаратів найчастіше застосовують гідроокис алюмінію [8].

Отримані бактеріальні анатоксини перевіряють на безпечність (токсичність), специфічну активність (антигенні та імуногенні властивості) та стерильність. Проте, створення препаратів для щеплення, які будуть більш безпечними для людей, пов'язане з поглибленням знань щодо будови бактеріальних токсинів і механізмів їх взаємодії з тим чи іншим модифікаційним чинником. На сучасному етапі розвитку біотехнологічних процесів виробництво анатоксинів потребує вдосконалення, яке можливе за рахунок більш якісної очистки їх від домішок, зменшення концентрації або повної заміни формальдегіду при одержанні вакцинних препаратів.

Виходячи з викладеного матеріалу, на наш погляд, найбільш критичним етапом виробництва вакцин, які містять анатоксини, є інактивація екзотоксину за допомогою формальдегіду, що призводить до утворення не до кінця відомих хімічних модифікацій токсину та похідних формаліну, які утворились в результаті вищезазначеної взаємодії. Утворені сполуки здатні негативно впливати на макроорганізм щеплених людей за рахунок побічних реакцій. Тому очищення від баластних білків, є вельми актуальною проблемою, яка потребує різнобічного вивчення.

Метою нашої роботи стало фракційне розділення промислового дифтерійного токсину та правцевого анатоксину з ціллю надання імунобіологічної характеристики отриманих білкових фракцій.

Робота є фрагментом планової науково-дослідної роботи ДУ «ІМІ ім. І. І. Мечникова НАМН України» «Імунобіологічна характеристика окремих фракцій дифтерійного, правцевого анатоксинів та режимів модифікацій екзотоксинів фізико-хімічними методами».

Матеріали та методи

Об'єктом дослідження були натуральний дифтерійний токсин і правцевий анатоксин, які були отримані з виробництва ПАТ «ФАРМСТАНДАРТ-БІОЛІК» (м. Харків), згідно з договором про науково-практичне співробітництво.

Хроматографічні дослідження проводили методом гель-фільтраційної (ексклюзійної або гель-проникаючої, або ситової) хроматографії [9]. Метод

ґрунтується на розділенні молекул речовини за розміром за рахунок їх різної здатності проникати у пори носія. При цьому першими з колонки виходять більші за розміром молекули (більшої молекулярної маси), які здатні проникати у мінімальне число пор носія. Останніми елюються речовини з малими розмірами молекул, які вільно проникають у пори сорбенту.

Обладнання та матеріали**:**

- хроматографічна колонка з внутрішнім діаметром 16 мм та довжиною 400 мм заповнена полівініловим гелем TSK-Gel TOYOPEARL HW-40 Fine (TOYO SODA MFG, Co, LTD, Japan);

- як елюент використовували фосфатно-сольовий буфер (NaH_2PO_4/ Na_2HPO_4 30 ммоль/л та 100 ммоль/л NaCl, pH 7,4);

- буфер подавався у колонку через петльовий інжектор за допомогою перистальтичного насосу LKB 2132 Microperpex, Швеція;

- реєстрацію фракцій проводили за допомогою ультрафіолетового монітору LKB 2238 UVICORD S II, Швеція, при довжині хвилі 254 нм у відносних оптичних одиницях у аналітичному режимі 0,05 AUFS (для препаративної хроматографії – 2,0 AUFS);

- сигнал детектора записували у вигляді хроматограми 2-х канальним самопищущим потенціометром LKB 2210 Recorder 2-Channel;

- паралельно з записом на самописці сигнал подавався на інтегратор Waters 746 Data Moduls, який реєстрував час утримання фракцій у колонці (RT) у хвилинах, площу під піком фракцій (AREA) у мм^2 та співвідношення у відсотках окремих фракцій;

- швидкість потоку елюенту (FR) під час кожної хроматографії вимірювалась 5 разів за допомогою каліброваної градуйованої піпетки на 5 мл. Середня швидкість потоку складала 1,66 мл/хв.;

- попередньо колонка калібрувалась стандартними сполуками з відомими молекулярними масами. За даними хроматографії стандартних речовин складався калібрувальний графік, у якому на осі ординат відмічали значення десяткового логарифму молекулярних мас речовин, а на осі абсцис – відношення об'єму утримання (V_R) у мл до V_o у мл, значення якого визначалось за об'ємом утримання декстрану блакитного (2000 кДа).

V_R – об'єм утримання (об'єм елюювання або виходу) – об'єм елюенту, який зібрано на виході з колонки до моменту, який відповідає максимуму концентрації компоненту суміші (максимум піку на хроматограмі).

Визначивши співвідношення V_R/V_o одержаних фракцій на основі калібрувального графіку визначали молекулярні маси фракцій. У препаративному режимі окремі фракції збирали за допомогою колектору фракцій LKB 2070 ULTRORAC II по 4 мл.

Дослідження проведені за участі Інституту проблем кріобіології і кріомедицини НАН України (Семенченко А. Ю.).

Визначення специфічної активності (антигенні властивості анатоксину в реакції антитоксин-зв'язування) правцевого анатоксину проводилось згідно зі стандартною методикою [8] та нормативною документацією ПАТ «ФАРМСТАНДАРТ-БІОЛІК» (СОП ОБК №005 К, код Ф-64-157, затверджена 08.2006 р.) із стандартною протиправцевою сироваткою (ОСО 42-28-246-09 П, ГІСК ім. Л.А. Тарасевича, Росія), з подальшим визначенням на білих мишах одиниць зв'язування (ОЗ). Якщо досліджуваний препарат має антигенні властивості анатоксину, то він зв'язується з антитоксином. Причому чим більше антитоксину може зв'язати досліджуваний анатоксин, тим вища його антигенна активність. Тварин відбирали з розрахунку 4 білі миші (вагою 16-18 г) на кожне розведення проби, що досліджувалась, 4 білі миші для позитивного (стандартний тест-токсин) і негативного (стандартний тест-токсин і стандартна протиправцева сироватка) контролів. Спостереження за тваринами вели впродовж 4 діб з визначенням стану (0 – відсутність характерних ознак захворювання; t_1 – ригідність лапки, в яку введена суміш; t_2 – загальний правець з викривленням хребта і ригідністю лапки; t_3 – тяжка форма загального правця). Дослідження проведені на виробничій базі ПАТ «ФАРМСТАНДАРТ-БІОЛІК».

Визначення токсичності дифтерійного токсину та його складових проводили на лабораторних тваринах (мурчаки вагою 350-400 г). У день досліду їм голили шкіру з боків ближче до спинки та вводили внутрішньошкірно 0,2 мл нативного токсину. Паралельно з дослідними ставили контрольні проби. За тваринами спостерігали впродовж 72 год. Епідермальні реакції оцінювали наступним чином: 0 - відсутність характерних ознак пошкодження епідермісу, I - гіперемія, II – наявність інфільтрату, III - некроз. Якщо отриманий препарат не викликав місцевих реакцій, або викликав пошкодження I ступеню, які минали протягом 72 год., то він визнавався не токсичним [8].

Визначення безпечності дифтерійних препаратів.

Лабораторним тваринам (мурчаки вагою 350-400 г) вводили підшкірно по 2,5 мл препарату у кожній бік (загалом 5,0 мл). За тваринами спостерігали впродовж 45 діб. Препарат визнавався безпечним, якщо лабораторні тварини набирали вагу протягом всього часу спостереження. До того ж, у них були відсутні паралічі, парези та місцеві реакції. Згідно з нормативною документацією в місці введення препарату допускається утворення невеликих ущільнень, які можуть зберігатися впродовж 30 і більше діб [8]. Мурчаки, що загинули, підлягали розтину та детальному вивченню патологоанатомічної картини внутрішніх органів.

У роботі з тваринами керувались наступними нормативними документами: ДВСТ 421-88 «Тварини лабораторні. Технологічний процес з дотримання основних положень Конвенції Ради Європи про охорону хребетних тварин, що використовуються в експериментальних наукових цілях» (18.03.1986), Директива ЄВС за № 609 від 24.11.1986 р., Наказ МОЗ України за № 281 від 01.11.2001 р.

Визначення специфічної (антигенної) активності дифтерійного токсину в реакції флокуляції.

Для постановки реакції використовували протидифтерійну флокулюючу сироватку (ОСО 42-28-249-10 П, ГІСК ім. Л.А. Тарасевича, Росія). Безпосередньо перед постановкою реакції сироватку розво-

дили в ізотонічному розчині хлориду натрію до кінцевої концентрації 200 Lf у 1 мл.

До однакових за діаметром пробірок наливали розведену флокулюючу сироватку у зростаючому об'ємі (кількість сироватки підбирали з урахуванням титру токсину та його об'єму у суміші) та 2 мл токсину, що досліджувався. Після додавання токсину до сироватки суміш ретельно перемішували, а штатив із пробірками розміщували на водяній бані при 45-50 ^{0}C. При постановці реакції враховували час, що пройшов після змішування сироватки з токсином, до початку ініціальної флокуляції. Пробірка, де флокулят випадав раніше за все, відповідала точці еквівалентності [8]. Рекомендований час флокуляційної реакції 5-15 хв., 20-30 хв. – відстрочена реакція. Якщо флокуляція не відбувається впродовж 180 хв. визнається, що препарат не володіє специфічною активністю.

Кількість флокулюючих одиниць (Lf) розраховували за формулою:

$$A = \frac{V \times 200}{2},$$

де А – кількість флокулюючих одиниць;

V - кількість флокулюючої сироватки у точці еквівалентності;

200 – перерахунок на титр сироватки (200 Lf/мл);

2 – перерахунок на кількість токсину у пробі.

Статистична обробка досліджень.

Статистична обробка даних здійснювалась у відповідності з правилами рядової і альтернативної варіаційної статистики як викладено у посібниках [10-13].

Результати обробляли за допомогою персонального комп'ютера із застосуванням комп'ютерних програм Statistika-7, Microsoft Office Excel 2003.

Результати та обговорення

На цей час в імунопрофілактиці застосовується очищений правцевий анатоксин, адсорбований на гідроокисі алюмінію. Основним діючим компонентом є очищений від баластних речовин та знешкоджений токсин (тетаноспазмін).

Загальноприйнятим підходом до розподілу пептидів вважають рідинну гель-хроматографію [9, 14]. Значною перевагою обраного методу в порівнянні з багатьма іншими є відсутність необхідності концентрування дослідних зразків. Проте, для встановлення потенційної біологічної активності одержаних речовин необхідне їх подальше вивчення на експериментальних моделях *in vivo*.

З метою визначення кількості баластних речовин, які можуть викликати сенсибілізацію при подальший імунізації, були проведені хроматографічні дослідження очищеного за допомогою хімічних (осадження солями) та фізичних (ультрафільтрація) методів готового правцевого анатоксину та нативного дифтерійного токсину промислового виробництва серій №5 та №001007.

При гель-фільтраційній хроматографії правцевого анатоксину було отримано дві білкові фракції. Фракція А складалась із білків з молекулярною масою від 12 кДа і вище та становила (34,22)% від загальної кількості фракцій. Найбільшу питому вагу становила фракція В - (65,78)% від загальної кількості фракцій, яка складалась із білків з молекулярною масою нижче 2 кДа.

Оскільки основним компонентом правцевого екзотоксину є тетаноспазмін, що представляє білок з відносною молекулярною масою 150-160 кДа, доцільно зробити припущення, що фракція В представлена баластними білками.

Для підтвердження того, що фракція В містить баластні білки, проби, після очищення методом мембранної фільтрації та перевірки на стерильність, вводили білим мишам для визначення безпечності та специфічної активності. Якщо досліджувана фракція містить дозу антигену, яка зв'язує 0,1 АО, то через 4 доби мають загинути 50% піддослідних тварин. Якщо препарат має нижчу дозу антигену, то через 4 доби загине 100% тварин.

Проведеними дослідженнями встановлено, що через 4 доби всі піддослідні тварини загинули. Таким чином експериментально доведено, що фракція В правцевого анатоксину не містить антигенних речовин, тобто представлена баластними білками.

При гель-фільтраційній хроматографії дифтерійного токсину серії №5 було отримано п'ять білкових фракцій, а серії №001007 – лише три. У обох випадках, найбільшу питому вагу від загальної кількості фракцій становила фракція А, яка складалась із білків з молекулярною масою більш ніж 45 кДа (табл. 1).

Таблиця 1 - Фракційний склад дифтерійного токсину (ДТ)

Серія ДТ	Фракції, (%)				
	A	B	C	D	E
5	98,1	1,0	0,7	0,1	0,1
001007	99,5	0,1	0,4	-	-

Оскільки дифтерійний екзотоксин представляє собою білок з відносною молекулярною масою близько 62 кДа, доцільно зробити припущення, що фракції В, С, D та Е представлені баластними білками.

Для підтвердження того, що зазначені вище фракції представлені баластними білками було визначено їх специфічну активність (табл. 2, 3).

Таблиця 2 - Специфічна активність отриманих фракцій ДТ серії № 5

Фракція	Активність, Lf	Час флокуляції, хв.
A	130±5	5
B	0	-
C	0	-
D	0	-
E	0	-

Таблиця 3 - Специфічна активність отриманих фракцій ДТ серії №001007

Фракція	Активність, Lf	Час флокуляції,

		хв.
A	115±5	10
B	0	-
C	0	-

Як видно з приведених таблиць, специфічною активністю володіла тільки фракція А.

Для підтвердження того, що до складу білків фракції А входить дифтерійний токсин було визначено її токсичність та безпечність у пробах *in vivo* (табл. 4).

Таблиця 4 - Визначення токсичності виділених фракцій ДТ

Фракція	Токсичність (24 год. / 72 год.)	Безпечність
А, серія 5 ДТ	III/III	-
А, серія 001007 ДТ	III/III	-

Примітки:
1. «0» - відсутність пошкодження епідермісу
2. «I» - гіперемія
3. «II» – наявність інфільтрату
4. «III» – некроз
5. «+» - препарат є безпечним (тварини живі, набирають вагу)
6.«-» - препарат є небезпечним (тварини загинули)

Під час розтину загиблих тварин, визначено, що у місці введення препаратів спостерігався набряк, зафіксовані крововиливи в тканини, наявність транссудату в плевральній порожнині, багаточисельні геморагії в легенях, виявлена збільшена в розмірах та гіперемована надниркова залоза, а також поодинокі крововиливи в ній.

Таким чином, експериментально доведено, що до складу фракції А входить дифтерійний токсин, а всі інші фракції є баластними білками.

Висновки

1. При гель-фільтраційній хроматографії очищеного промислового правцевого анатоксину отримано дві білкові фракції: А (34,22)% від загальної кількості фракцій та В - (65,78)%.
2. Встановлено, що фракція В правцевого анатоксину представлена баластними білками та не містить специфічних антигенних структур.
3. Визначено, що при гель-фільтраційній хроматографії нативного дифтерійного токсину найбільшу питому вагу від загальної кількості фракцій становила фракція А.
4. Експериментально доведено, що фракції дифтерійного токсину, окрім А, є баластними білками.
5. Встановлено, що до фракційного складу дифтерійного токсину та правцевого анатоксину промислового виробництва входять баластні білки.

Література

1. Супотницкий, М. В. Микроорганизмы, токсины и эпидемии / М. В. Супотницкий. - М., 2000 [Електронний ресурс]. Режим доступу : http://supotnitskiy.ru/book/book1-1-5.htm.
2. Медицинская микробиология, вирусология и иммунология [Текст] : [учебник для вузов] : под ред. акад. РАМН А. А. Воробьева. – М. : МИА, 2004. – 691 с. : ил. – 5000 экз. – ISBN 5-89481-209-7.
3. Загальна характеристика дифтерійного і правцевого токсинів та їх антигенних дериватів (огляд літератури) [Текст] : / С. В. Калініченко [та ін.] // Annals of Mechnikov Institute. – 2010. - № 3. - С.5-8. Режим доступу : http://www.nbuv.gov.ua/e-journals/AMI/2010/10ksvzhd.pdf
4. Романюк, С. І. Антигенні та імунобіологічні властивості дифтерійного токсину і його субодиниць [Текст] : автореф. дис. канд. біол. наук : 02.00.10 / Сергій Іванович Романюк ; НАН Украины, ін-т біоорган. хімії та нефтехімії. - К., 2002. - 20 с.
5. Metz, B. Structural Characterisation of Diphtheria Toxoid [Text] / Bernardus Metz. – 2005. - 198 p. – ISBN 90-393-3941-4.
6. Некоторые механизмы формольной детоксикации столбнячного токсина (обзор литературы) [Электронный ресурс] / Н. В. Кашпур [и др.] / Annals of Mechnikov Institute. – 2009. - № 1. - С.24-31. Режим доступа : http://www.nbuv.gov.ua/e-journals/ami/2009/09knvnmf.pdf.
7. Identification of Formaldehyde-induced Modifications in Proteins reaction with model peptides [Electronic resource] / B. Metz [et al] // THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY. – 2004. - V. 279, №. 8. - P. 6235–6243. – ISSN:1083-351X. : http://www.jbc.org/content/279/8/6235.full.pdf+html?sid=a322df09-2524-422b-8e5e-42335a214119.
8. Руководство по вакцинному и сывороточному делу [Текст] / под ред. П. Н. Бургасова. – М. : «Медицина», 1978. – 440 с.
9. Препаративная жидкостная хроматография [Текст] : Пер. с англ. / Б. Бидлингмейер, Б. Фрайд, Г. Хегнауер и др. / Под ред. Б. Бидлингмейера — М. : Мир, 1990. — 360 с.
10. Лапач, С. Н. Статистические методы в медико-биологических исследованиях с использованием Exel [Текст] / С. Н. Лапач, А. В. Чубенко, П. Н. Бабич. – К. : Морион, 2000. – 320 с. – ISBN 966-7632-16-4.
11. Боровиков, В. П. Statistica. Статистический анализ и обработка данных в среде Windows [Текст] / В. П. Боровиков, И. П. Боровиков. – М. : Филинъ, 1998. – 592 с.
12. Прикладная медицинская статистика [Текст] / [под ред. В. М. Зайцева, В. Г. Лифляндского]. – СПб. : СПбГМА им. И. И. Мечникова, 2000. – 299 с.
13. Гельман, В. Я. Медицинская информатика: практикум [Текст] / В. Я. Гельман. – [2-е изд.]. – СПб. : Питер, 2002. – 480 с.
14. Хроматографічні методи: Класифікація, принципи та практичне застосування (огляд літератури) [Текст] : / Т. А. Рижкова [та ін.] // Annals of Mechnikov Institute. – 2010. - № 4. - С.26-34. Режим доступу : http://www.nbuv.gov.ua/e-journals/AMI/2010/10rtacmk.pdf

УДК 57.042:574:579.66:663.1

ФРАКЦІЙНИЙ СКЛАД ПРАВЦЕВОГО АНАТОКСИНУ ТА ДИФТЕРІЙНОГО ТОКСИНУ ПРОМИСЛОВОГО ВИРОБНИЦТВА

Бабич Є.М., Калініченко С.В., Рябовіл О.В., Рижкова Т.А., Скляр Н.І., Ждамарова Л.А., Білозерський В.І., Плугатор Т.М., Бобирева І.В., Большакова Г.М.

За допомогою гель-фільтраційної хроматографії визначено фракційний склад дифтерійного токсину та правцевого анатоксину промислового виробництва. Встановлено, що до складу дифтерійного токсину та правцевого анатоксину промислового виробництва, окрім специфічних антигенних структур, входять баластні білки.

Ключові слова: дифтерійний токсин, правцевий анатоксин, хроматографія

УДК 57.042:574:579.66:663.1

ФРАКЦИОННЫЙ СОСТАВ СТОЛБНЯЧНОГО АНАТОКСИНА И ДИФТЕРИЙНОГО ТОКСИНА ПРОМЫШЛЕННИГО ИЗГОТОВЛЕНИЯ

Бабич Е.М., Калиниченко С.В., Рябовол Е.В., Рыжкова Т.А., Скляр Н.И., Ждамарова Л.А., Белозерский В.И., Плугатор Т.Н., Бобирева И.В., Большакова Г.М.

С помощью гель-фильтрационной хроматографии определен фракционный состав дифтерийного токсина и столбнячного анатоксина промышленного изготовления. Установлено, что кроме специфических антигенных структур в состав дифтерийного токсина и столбнячного анатоксина входят балластные белки.

Ключевые слова: дифтерийный токсин, столбнячный анатоксин, хроматография.

UDC 57.042:574:579.66:663.1

FRACTIONAL COMPOSITION OF INDUSTRIAL TETANUS TOXOID AND DIPHTHERIA TOXIN

Babych Ye.M., Kalinichenko S.V., Ryabovol E.V., Ryzhkova T.A., Sklyar N.I., Zhdamarova L.A., Bilozerskii V.I., Plugator T.M., Bobyreva I.V., Bolshakova G.M.

Fractional composition of industrial diphtheria toxin and tetanus toxoid was determined with the use of gel filtration chromatography. It was established, that with the exception of specific antigenic structures, diphtheria toxin and tetanus toxoid contained ballast proteins.

Key words: diphtheria toxin, tetanus toxoid, chromatography.