

УДК 579.61: 579.222.3: 57.023: 57.033: 579.222.3

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА ДИФТЕРІЙНОГО І ПРАВЕЦЕВОГО ТОКСИНІВ ТА ЇХ АНТИГЕННИХ ДЕРИВАТИВ

Калініченко С.В.¹, Бабич Є.М.¹, Рижкова Т.А.¹,
Скляр Н.І.¹, Рябовіл О.В.², Плугатор Т.М.²,
Антушева Т.І.¹

1 - ДУ «ІМІ ім. І.І.Мечникова АМНУ», м Харків
2 – ЗАО «Біолік», м. Харків

На теперішній час вакцинація є найбільш доступним та економічно ефективним засобом профілактики багатьох інфекційних хвороб [1-5]. За даними Всесвітньої організації охорони здоров'я (ВООЗ) масова вакцинопрофілактика (охоплення 95% дітей перших років життя) призвела до зниження захворюваності на кір, кашлюк та правець на 95-98% у порівнянні з довакцинним періодом, а в 102 країнах світу на початку ХХІ століття не було зареєстровано, або реєструвались поодинокі випадки дифтерії [1, 4, 5]. Припинення чи недотримання схем вакцинації неминуче призводить до розвитку епідемій: повернення кашлюку спостерігали в Японії, дифтерії – в Росії, Україні та інших країнах СНД, поліомієліту – на Гаїті, в Нідерландах, Югославії, Азербайджані, кору – в Колумбії та Венесуелі [1-5]. На сьогодні імунізація вважається настільки важливою, що у більшості країн практично все дитяче населення вакцинується (шляхом щеплення) проти вірусів кору, епідемічного паротиту та поліомієліту атенуйованими вакцинами, а проти таких хвороб, як правець та дифтерія – інактивованими токсинами [4, 5]. Прогнозується, що національний календар щеплень 2025 р. буде складатись із 23 вакцинних препаратів для дітей і 3 для дорослих [4, 5].

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 місце відповідно після найнебезпечнішого ботуліністичного токсину.

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.

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 [6-13].

Дифтерійний гістотоксин (екзотоксин) синтезується у вигляді єдиного поліпептидного ланцюга (протоксин), де А- і В-фрагменти з'єднані дисульфідними містками. Протоксин активується під впливом протеолітичних ферментів і тіолових з'єднань, що призводить до утворення біфункціональної А-В-структури токсину. Обмежений протеоліз відбувається як під впливом протеаз самого мікроба, так і супутньої мікрофлори, або під впливом протеаз макроорганізму. Відновлення дисульфідних груп у сульфідгідрильні веде до завершення фрагментації ланцюга, але розходження фрагментів що утворились (А і В), відбувається тільки після контакту з рецепторами чутливої клітини. Таким чином, рецептори зв'язують дифтерійний гістотоксин виключно в інтактному стані його молекули. Фрагмент В взаємодіє зі специфічними гангліозидними рецепторами клітини і бере участь в утворенні транспортного каналу для фрагмента А. Активованій фрагмент А відповідає за токсичність. Потрапивши до цитозолу еукаріотичної клітини він стає недосяжним для дії антитоксичних антитіл, які не здатні проникати крізь мембрану клітини. В уражених клітинах фрагмент А має ферментативну активність. Він відноситься до АДФ(аденозинудифосфат)-рибозилтрансфераз, які переносять АДФ-рибозу, що відщеплюється від НАД⁺ (нікотинаміддинуклеотид) з одночасним звільненням нікотинамідну, на акцепторні білки-мішені. Дифтерійний екзотоксин викликає АДФ-рибозилування чинника елонгації EF-2 (трансферази 2), необхідного для побудови пептидних ланцюгів на рибосомах еукаріотичної клітини. Блокада функціональної активності цього ферменту веде до порушення синтезу білка на стадії елонгації та загибелі клітин у результаті некрозу. Тобто, за механізмом дії дифтерійний токсин (ДТ) відноситься до інгібіторів білкового синтезу [7-9, 12, 13].

Правцевий екзотоксин складається з двох компонентів: тетаноспазмину (впливає на нервову систему викликаючи тонічні скорочення скелетної мускулатури) та тетанолізіну (викликає лізис еритроцитів). Основним компонентом зазначеного токсину є тетаноспазмін (відноситься до цинкметалопротеаз), який має більш складну молекулу. Синтезується у вигляді неактивних поліпептидів з молекулярною вагою 150-160 кДа (кілодальтон), які при лізисі бактеріальної клітини звільнюються та активуються завдяки протеолітичному розщепленню відкритої частини петлі в структурі молекули. Кожна активна молекула тетаноспазмину складається з важкого (100-105 кДа) та легкого (50-55 кДа) ланцюгів, зв'язаних проміж собою дисульфідним містком. Важкі ланцюги мають два домена – для транслокації токсину (N-термінальна послідовність) і для зв'язування з мішенню (C-термінальна послідовність). Легкі ланцюги мають цинк-зв'язуючий центр, необхідний для цинк-залежної протеази, яка активує молекулу [4]. Механізм дії пов'язаний зі стримуванням звільнення гліцину і γ -аміноасляної кислоти (нейромедіатори) у синапсах (токсин зв'язується з синаптичними білками синаптобrevіном

і целюбревіном), завдяки чому виникає спастичний параліч [7, 10, 11].

Специфічна активність токсинів залежить від окремих ділянок білкової молекули, які отримали назву «активних центрів» [6-8]. Просторова конфігурація та послідовність чергування амінокислот поліпептидного ланцюга визначає можливість взаємодії молекули токсину з інактивуючими речовинами (рис. 1). Модифікаційних змін структури токсинів можливо досягнути генетичним шляхом або хімічним та фізико-хімічним впливом.



Рис. 1. Трьохвимірна структура токсинів

У 1923 році французький вчений Г. Рамон встановив, що обробка формаліном ряду бактеріальних токсинів, призводить до втрати токсичності при збереженні імуногенних властивостей. Отримані препарати Рамон назвав анатоксинами [7].

На цей час у вакцинопрофілактиці широко застосовуються правцевий та дифтерійний анатоксини, які отримують знешкодженням відповідних токсинів за допомогою формаліну й тепла.

Відомо, що формальдегід є агентом, який сприяє утворенню міжмолекулярних перехресних зв'язків, що здатні інактивувати, стабілізувати чи іммобілізувати білкові молекули. На першій стадії інактивації формальдегід взаємодіє з аміногрупами N-термінальних кінців амінокислотних залишків і боковими ланцюгами залишків аргініну, цистеїну, гістидину та лізину бактеріальних токсинів, але не формує міжмолекулярних перехресних зв'язків між двома первинними аміногрупами. У залежності від послідовності амінокислотних залишків пептиди після обробки формаліном піддаються різноманітним хімічним модифікаціям: утворенню метилоамінних груп, основ Шиффу та метиленових містків. Поява метилоамінних груп та основ Шиффу є зворотнім процесом, тому ці компоненти важко виявити. Найбільш важлива модифікація протеїнів (пептидів), індукована формаліном, - формування стабільних метиленових містків (другий етап інактивації), які утворюються при взаємодії метилоамінних груп з активними радикалами амінокислот, що ма-

ють в своїй структурі амідні, гуанідинові, індольні, фенольні та мідазолні групи (тирозин, аргінін, гістидин, триптофан) [12].

Таким чином, знешкодження бактеріальних токсинів формаліном за певних умов призводить до порушення просторової конфігурації токсичного білку за рахунок виникнення зшивок між окремими ділянками поліпептидного ланцюга токсину, або між його окремими субодиницями, що перешкоджає розпаду молекули токсину на два фрагмента та вивільненню патогенного фрагменту А [7, 12]. Тобто, інактивація (знешкодження) бактеріальних токсинів досягається шляхом модифікації їх нативної структури, яка відбувається завдяки зміні функцій окремих частин токсичного білку.

На сьогоднішній час анатоксини отримують шляхом додавання 0,3-0,8 відсотків формаліну (з перерахунку вмісту 40% формальдегіду) до фільтратів культур токсигенних мікробів. Але, більша частина формаліну зв'язується з білками поживних середовищ і тільки незначна його кількість вступає в реакцію з токсином. Тому повнота знешкодження токсину залежить як від кількості формаліну який додають, так і від кількості азотистих речовин у бактеріальних фільтратах [12].

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 [12].

Нативні анатоксини містять різні баластні білки та інші антигенні речовини (залишки поживних середовищ, продукти метаболізму мікрорганізмів). 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 сенсibilізуючі властивості. Для зниження реактогенності і сенсibilізації 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 слабо 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 вповільнення процесів усмоктування. У якості сорбентів біологічних препаратів найчастіше застосовують гідроокис алюмінію [9, 11, 12].

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 удосконалення, 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 пошук нових хімічних сполук або хімікофізичних методів отримання антигенних дериватів з бактеріальних токсинів є вельми актуальною проблемою, яка потребує різнобічного вивчення.

Література:

1. ВОЗ: Иммунизация от болезней, имеющих значение для общественного здравоохранения [Электронный ресурс]: Информационный бюллетень № 288, Март 2005 г. - Режим доступа: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs288/ru/index.html>.
2. Наказ. Наказ № 545 від 24.11.2003 [Текст]: Про стан імунітету населення України до дифтерії та правцю [Електронний ресурс]: – Вид. офіц. – К.: Міністерство охорони здоров'я України, 2003. - Режим доступу: http://www.moz.gov.ua/ua/portal/dn_20031124_545.html
3. WHO: Immunization surveillance, assessment and monitoring [Електронний ресурс]: WHO vaccine-preventable diseases: monitoring system 2010 global summary : Ukraine reported cases, 9 September 2010. Режим доступу: http://apps.who.int/immunization_monitoring/en/globalsummary/timeseries/tsincidencebycountry.cfm?C=UKR.
4. ВОЗ: Документы с изложением позиции в отношении вакцин [Електронний ресурс]: 9 сентября 2010. Режим доступу: <http://www.who.int/topics/immunization/positionpapers/ru/index.html>.
5. WHO: Vaccines and immunization [Електронний ресурс]: WHO European Region, 9 September 2010. Режим доступу: <http://www.euro.who.int/en/what-we-do/health-topics/disease-prevention/vaccines-and-immunization>.
6. Супотницький, М. В. Микроорганизмы, токсины и эпидемии [Текст] / М. В. Супотницький. - М., 2000 [Електронний ресурс]. Режим доступу: <http://supotnitskiy.ru/book/book1-1-5.htm>.
7. 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.
8. Частная медицинская микробиология с техникой микробиологических исследований [Текст] / под ред. А. С. Лабинской, Л. П. Блинковой, А. С. Ешиной [учебное пособие]. – М.: ОАО «Издательство «Медицина», 2005. – 600 с.: ил. – ISBN 5-225-04666-5.
9. 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 України, ін-т біоорган. хімії та нефтехімії. - К., 2002. - 20 с.
10. Marlee, J. H. Amino Acid Analysis and Molecular Weight Determination of Tetanus Toxin [Text] / J. H. Marlee, L. R. Wayne // Infection and immunity. – 1971. – V.1. - P. 133-140.
11. Некоторые механизмы формальной детоксикации столбнячного токсина (обзор литературы) [Електронний ресурс] / Н. В. Кашпур Н.В. [и др.] / Annals of Mechnikov Institute. – 2009. - № 1. - С.24-31. Режим доступу: <http://www.nbuu.gov.ua/e-journals/ami/2009/09knvnmf.pdf>.
12. Identification of Formaldehyde-induced Modifications in Proteins reaction with model peptides [Електронний ресурс] / В. Metz [et al] // THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY. – 2004. - V. 279, №. 8. - P. 6235–6243. – ISSN:1083-351X. Режим доступу до журналу: <http://www.jbc.org/content/279/8/6235.full.pdf+html?sid=a322df09-2524-422b-8e5e-42335a214119>.
13. Metz B. Structural Characterisation of Diphtheria Toxoid [Text] / Bernardus Metz. – 2005. - 198 p. – ISBN 90-393-3941-4.

УДК 579.61: 579.222.3: 57.023: 57.033: 579.222.3 ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА ДИФТЕРІЙНОГО І ПРАВЦЕВОГО ТОКСИНІВ ТА ЇХ АНТИГЕННИХ ДЕРИВАТИВ

Калініченко С.В., Бабич Є.М., Рижкова Т.А., Скляр Н.І., Рябовіл О.В., Пługатор Т.М., Антушева Т.І.

У статті наведено сучасні погляди на структуру та механізми дії екзотоксинів збудників дифтерії та правця. Окреслено деякі аспекти отримання анатоксинів за допомогою формальдегіду, що стосуються хімічних модифікацій вищезазначених токсинів, які призводять до втрати токсичності при збереженні імуногенних властивостей. Висвітлено етапи виробництва імунобіологічних препаратів для вакцинації на основі анатоксинів. Зазначено, що найбільш критичним етапом виробництва вакцин на основі токсодів є інактивація екзотоксинів за допомогою формальдегіду, оскільки утворені сполуки здатні негативно впливати на організм щеплених.

Ключові слова: дифтерійний токсин, правцевий токсин, формальдегід, анатоксини, імунобіологічні препарати.

УДК 579.61: 579.222.3: 57.023: 57.033: 579.222.3
ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ДИФТЕРИЙНО-
ГО И СТОЛБНЯЧНОГО ТОКСИНОВ И ИХ
АНТИГЕННЫХ ДЕРИВАТОВ

**Калиниченко С.В., Бабич Е.М., Рыжкова Т.А.,
Скляр Н.И., Рябовол Е.В., Плугатор Т.Н., Анту-**
шева Т.И.

В статье рассмотрены современные взгляды на структуру и механизмы действия экзотоксинов возбудителей дифтерии и столбняка. Подчеркнуты некоторые аспекты получения анатоксинов с помощью формальдегида, касающиеся химических модификаций указанных токсинов, которые приводят к потере токсичности при сохранении иммуногенных свойств. Описаны этапы производства иммунологических препаратов на основе анатоксинов. Отмечено, что наиболее критическим этапом производства вакцин на основе токсидов является инактивация токсинов с помощью формальдегида, поскольку образующиеся вещества способны отрицательно влиять на организм вакцинированных.

Ключевые слова: дифтерийный токсин, столбнячный токсин, формальдегид, анатоксины, иммунологические препараты.

UDC 579.61: 579.222.3: 57.023: 57.033: 579.222.3
GENERAL CHARACTERISTIC OF DIPHTHE-
RIA AND TETANUS TOXINS AND THEIR AN-
TIGENIC DERIVATIVES

**Kalinichenko S.V., Babych E.M., Ryzhkova T.A.,
Sklyar N.I., Rjabovol O.V., Plugator T.N., Antushe-**
va T.I.

The modern views on diphtheria and tetanus exotoxins' structure are presented in this article. Some aspects of toxoids obtaining by formaldehyde treatment are described. Chemical modifications of above mentioned toxins that result loss of toxicity but preservation of immunogenicity are characterized. The stages of immunological preparations based on toxoids production are pointed. It is showed that the most critical step of these vaccines production is exotoxins inactivation because the new reaction products after incubation with formaldehyde may cause negative influence on vaccinated people.

Key words: diphtheria toxin, tetanus toxin, formaldehyde, toxoids, immunological preparations.