

УДК 57.04:574:579.6:663.1

**ІМУНОБІОЛОГІЧНА ХАРАКТЕРИСТИКА  
ОКРЕМИХ ФРАКЦІЙ ПРАВЦЕВОГО  
АНАТОКСИНУ ДО ТА ПІСЛЯ ВПЛИВУ  
УЛЬТРАЗВУКОВИХ ХВИЛЬ**

**Бабич Є.М.<sup>1</sup>, Калініченко С.В.<sup>1</sup>, Рябовіл О.В.<sup>2</sup>,  
Ківва Ф.В.<sup>3</sup>, Рижкова Т.А.<sup>1</sup>, Скляр Н.І.<sup>1</sup>,  
Коваленко О.І.<sup>3</sup>, Плугатор Т.М.<sup>2</sup>, Егліт В.О.<sup>2</sup>,  
Білозерський В.І.<sup>1</sup>**

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

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

**3 - Інститут радіофізики та електроніки  
ім. О.Я. Усикова НАН України**

Активна імунізація населення України проти правцю, яка проводиться з 1960 року, забезпечила зниження захворюваності в цілому у 8,5 рази. Проте у 80-ті роки не відзначалося стійкої тенденції до подальшого зниження - щороку хворіло на правець від 90 до 110 осіб (0,18-0,2 на 100 000 населення). З 1993 року у зв'язку з напруженою епідемічною ситуацією в Україні з дифтерії значно активізувалася масова імунізація населення проти дифтерії та правця, що зумовило відчутне зниження захворюваності на правець - до 41 випадку (0,08 на 100 000) у 1998 році, причому на вікову групу до 14 років прийшовся лише один випадок захворювання [1-5]. Однак правцева інфекція в Україні і сьогодні залишається актуальною медичною та соціальною проблемою, оскільки займає за летальністю четверте місце після СНІДу, сказу та мієлоїдозу [1, 2, 3].

За останні 5 років летальність від правця в Україні перевищує 60% [2, 3]. Високу летальність зумовлюють: 1) вікова структура хворих (85% - люди похилого віку); 2) порушення у проведенні як планової активної, так і екстреної активно-пасивної імунізації, що не забезпечує належного захисного рівня протиправцевого імунітету; 3) відсутність належної санітарно-освітньої роботи, внаслідок чого майже 80% потерпілих після травм несвоєчасно або зовсім не звертаються по медичну допомогу; 4) наявність регіонів з високим ризиком зараження, де ступінь обсіменіння ґрунтів правцевою паличкою складає 95-98%.

Основним діючим компонентом протиправцевої вакцини є правцевий анатоксин, очищений від баластних речовин та адсорбований на гідроокисі алюмінію [6]. Існує багато способів очистки правцевого анатоксину: хімічні (осадження солями або органічними розчинниками), фізико-хімічні (обробка сорбентами, електродекантація, іонообмінна хроматографія, тощо) і фізичні (ультрафільтрація).

На цей час формується новий напрямок у хімії – мікрохвильова ультразвукова хімія (сонохімія), яка застосовує ультразвук для прискорення хіміко-технологічних процесів та вивчає хімічні реакції, які можливо змінювати за допомогою ультразвуку. Ультразвук сприяє прискоренню перебігу хімічних реакцій (як і з застосуванням каталізатору) або утворенню

нових реакційних продуктів за рахунок кавітації. Це надає змогу отримувати наночастки та контролювати їх магнітну анізотропію. Хімічні ефекти кавітації виникають внаслідок сонолюмінесценції (генерація світла при схлопуванні кавітаційних бульбашок) та порівнюються з ефектами дії низькотемпературної плазми або ударної хвилі. Вивчення кавітаційних процесів у магнітних та гравітаційних полях встановило нові ефекти перебігу хімічних реакцій: відбувається збільшення сили тяжіння молекул, їх кластерів і асоціантів, що призводить до зміни величини і знаку градієнту концентрації, зміщує рівновагу, інвертує фази за їх щільністю та змінює швидкість і конкуренцію процесів. [7].

Оскільки відомо, що подрібнення білкових сполук за допомогою ультразвукової кавітації збільшує площу стикування між речовинами та покращує відновлення дисперсійного білку, перспективним є використання ультразвуку для очищення антигенних препаратів від баластних білків.

Метою нашої роботи є надання імунобіологічної характеристики окремих фракцій правцевого анатоксину до та після впливу ультразвукових хвиль.

**Матеріали та методи**

Об'єктом дослідження став очищений правцевий анатоксин (ПА), отриманий з виробництва ПАТ «ФАРМСТАНДАРТ-БІОЛІК» (м. Харків), згідно договору про науково-практичне співробітництво.

*Хроматографічні дослідження* проводили методом гель-фільтраційної (ексклюзійної або гелі-проникаючої або ситової) хроматографії [8]. Дослідження проведені за участі Інституту проблем кріобіології і кріомедицини НАН України (Семенченко А. Ю.).

*Визначення специфічної активності (антигенні властивості анатоксина в реакції антитоксин-зв'язування)* правцевого анатоксину проводилось згідно зі стандартної методики та нормативної документації 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, ПІСК ім. Л.А. Тарасевича, Росія), з подальшим визначенням на білих мишах одиниць зв'язування (ОЗ) [6]. Дослідження проведені на виробничій базі ПАТ «ФАРМСТАНДАРТ-БІОЛІК».

У роботі був використаний ультразвуковий прилад ТУ 3468-001-42369179-03 (частота 130 кГц, потужність 9 Вт), наданий Інститутом радіофізики та електроніки ім. О.Я. Усикова НАН України (свідоцтво про атестацію № 100-3919/2011, чинно до 27.01.2014 р., видане ДП «Харківський регіональний науково-виробничий центр стандартизації, метрології та сертифікації») згідно договору про науково-практичне співробітництво.

*Статистична обробка досліджень.*

Статистична обробка даних здійснювалась у відповідності з правилами рядової і альтернативної варіаційної статистики як викладено у посібниках [9-12].

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

### Результати та їх обговорення

З метою визначення кількості баластних речовин, які можуть викликати сенсibilізацію при подальшій імунізації, були проведені хроматографічні дослідження очищеного за допомогою хімічних (осадження солями) та фізичних (ультрафільтрація) методів готового правцевого анатоксину промислового виробництва.

При гель-фільтраційній хроматографії правцевого анатоксину було отримано дві білкові фракції. Фракція А складалась із білків з молекулярною масою від 12 кДа й 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 було зробити припущення, що фракція В представлена баластними білками, в той час, як фракція А є основним специфічним компонентом ПА.

Для підтвердження того, що фракція В містить баластні білки, а фракція А є специфічним ком-

понентом правцевого анатоксину та може застосовуватись в якості імунобіологічного препарату, проби, після очищення методом мембранної фільтрації та перевірки на стерильність, вводили білим мишам для визначення специфічної активності.

Визначено, що специфічна активність фракції А становила, в середньому, 270 ОЗ/мл. Щодо фракції В, то 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.

Для очищення від зайвих баластних білків досліджуємих анатоксин обробляли фізичним чинником – ультразвуком, впродовж 1, 2, 3, 4, 5, 6 та 7 годин.

З метою встановлення складу зразків після впливу ультразвуку провели гель-фільтраційну хроматографію.

Експериментальні результати показали, що після обробки ПА ультразвуком відсотковий склад дослідних зразків зазнавав певних змін, які залежали від режиму УЗ обробки. Найбільш суттєві результати було отримано при застосуванні ультразвуку протягом 1 та 7 годин (табл. 1).

**Таблиця 1 – Фракційний склад правцевого анатоксину до та після дії ультразвуку**

Режими обробки	Фракції ПА, (%)	
	А	В
Контроль (необроблена УЗ проба)	34,22	65,78
УЗ 1 год.	81,82	18,18
УЗ 7 год.	41,9	58,1

При обробці ПА впродовж 7 годин вихід фракції А становив 41,9%, що в 1,2 рази більше ніж у необробленої УЗ проби. При обробці ПА впродовж 1 години вихід фракції А становив 81,82%, що в 2,4 більше у порівнянні з контролем.

Для подальших дослідів були взяті тільки фракції А. Визначення специфічної активності отри-

маних після впливу ультразвуку проб, як і в контролі, здійснювалось на тваринах.

Встановлено, що дія ультразвуку суттєво не впливала на специфічну активність отриманих фракцій А (табл. 2).

**Таблиця 2 – Специфічна активність білкової фракції А правцевого анатоксину до та після дії ультразвуку**

Час впливу УЗ, (год.)	Активність, (ОЗ/мл)
Контроль (необроблений УЗ)	270±5
1 год.	275±5
7 год.	260±5

Таким чином встановлено, що очищений промисловий правцевий анатоксин має баластні білки, яких можливо позбавитись за допомогою додаткової обробки ультразвуком. Зменшення кількості баластних білків в ПА буде сприяти зниженню алергічних реакцій при подальшій імунізації зазначеним імунобіологічним препаратом.

### Висновки

1. При гель-фільтраційній хроматографії очищеного промислового правцевого анатоксину було отримано дві білкові фракції: А – (34,22)% від загальної кількості фракцій та В – (65,78)%.

2. Експериментально встановлено, що фракція В правцевого анатоксину представлена баластними білками та не містить антигенних речовин.

3. Після обробки ПА ультразвуком відсотковий склад дослідних зразків анатоксину зазнавав певних змін, які залежали від режиму УЗ обробки. Так, при обробці ПА впродовж 7 годин вихід фракції А збільшувався в 1,2 рази, а при 1 годинній експозиції – в 2,4 рази за рахунок зменшення частки фракції В.
4. Після дії ультразвуку специфічна активність білкової фракції А правцевого анатоксину залишалась на рівні контролю.
5. Застосування ультразвуку призводить до зменшення кількості баластних білків.

#### References

1. WHO: Immunization against diseases of public health importance [Electronic resource] information bulletin № 288, March 2005. – Access mode: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs288/ru/index.html>.
2. Order. Order № 545, 24.11.2003: About Ukrainian population immunity against diphtheria and tetanus [Electronic resource]. – Official edition. – K.: Ministry of Public Health of Ukraine, 2003. – Access mode: [http://www.moz.gov.ua/ua/portal/dn\\_20031124\\_545.html](http://www.moz.gov.ua/ua/portal/dn_20031124_545.html).
3. WHO: Immunization surveillance, assessment and monitoring [Electronic resource]: WHO vaccine-preventable diseases: monitoring system 2010 global summary : Ukraine reported cases, 18 May 2012. – Access mode: [http://apps.who.int/immunization\\_monitoring/en/globalsummary/timeseries/tsincidencebycountry.cfm?C=UKR](http://apps.who.int/immunization_monitoring/en/globalsummary/timeseries/tsincidencebycountry.cfm?C=UKR).
4. WHO: Vaccine Position Papers [Electronic resource] May, 2012. – Access mode: <http://www.who.int/topics/immunization/positionpapers/ru/index.html>
5. WHO: Vaccines and immunization [Electronic resource]: WHO European Region, 18 May 2012. – Access mode: <http://www.euro.who.int/en/what-we-do/health-topics/disease-prevention/vaccines-and-immunization>.
6. A manual of vaccines and serums business [Text] / ed. by P.N. Bugrasov. – M.: Medicine, 1978. – 440 p.
7. Akopyan, V.B. Fundamentals interaction of ultrasound and biological objects: Ultrasound in medicine, veterinary medicine and experimental biology [Text] / V.B. Akopyan, Yu.A. Ershov. – M.: Bauman MSTU, 2005/ - 224 p. – ISBN 5-7038-2597-0.
8. Preparative liquid chromatography [Text]: Translated from English / B. Bidlingmeyer, B. Frayd, H. Henayer [et al.] / ed. by B. Bidlingmeyer. – M. Mir., 1990. – 360 p.
9. Lapach, S.N. Statistical methods in medical and biological researches using Excel [Text] / S.N. Lapach, A.V. Chubenko, P.N. Babych - K. Morion, 2000. – 320 p. – ISBN 966-7632-16-4.
10. Borovikov, V.P. Statistica. Statistical analysis and data proceeding in Windows / V. P. Borovikov, I. P. Borovikov. – M. Filin, 1998. – 592 p.
11. Applied medical statistic / ed. by V.M. Zaitsev, V.G. Lifyanskyi. – Petersburg. : Piter, 2002. – 480 p.

УДК 57.04:574:579.6:663.1

#### ІМУНОБІОЛОГІЧНА ХАРАКТЕРИСТИКА ОКРЕМИХ ФРАКЦІЙ ПРАВЦЕВОГО АНАТОКСИНУ ДО ТА ПІСЛЯ ВПЛИВУ УЛЬТРАЗВУКОВИХ ХВИЛЬ

Бабич Є.М., Калініченко С.В., Рябовіл О.В., Ківва Ф.В., Рижкова Т.А., Скляр Н.І., Коваленко О.І., Пługатор Т.М., Егліт В.О., Білозерський В.І.

За допомогою гель-фільтраційної хроматографії визначено фракційний склад правцевого анатоксину промислового виробництва до та після впливу ультразвукових хвиль. Встановлено, що до складу правцевого анатоксину промислового виробництва, окрім специфічних антигенних структур (фракція А), входили баластні білки (фракція В). Обробка анатоксину ультразвуком призводила до зменшення кількості баластних білків. Відсотковий склад отриманих фракцій залежав від режиму УЗ обробки.

**Ключові слова:** правцевий анатоксин, хроматографія, ультразвук

УДК 57.04:574:579.6:663.1

#### ИММУНОБИОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ФРАКЦИЙ СТОЛБНЯЧНОГО АНАТОКСИНА ДО И ПОСЛЕ ВОЗДЕЙСТВИЯ УЛЬТРАЗВУКОВЫХ ВОЛН

Бабич Е.М., Калиниченко С.В., Рябовол Е.В., Кивва Ф.В., Рыжкова Т.А., Скляр Н.И., Коваленко О.И., Пługатор Т.Н., Эглит В.А., Белозерский В.И.

С помощью гель-фильтрационной хроматографии определен фракционный состав промышленного столбнячного анатоксина до, и после воздействия ультразвуковых волн. Установлено, что кроме специфических антигенных структур (фракция А), в состав анатоксина входили балластные белки (фракция В). Обработка исследуемых проб анатоксина ультразвуком привела к уменьшению количества балластных белков. Процентный состав фракций зависел от режима воздействия ультразвуком.

**Ключевые слова:** столбнячный анатоксин, хроматография, ультразвук.

UDC 57.04:574:579.6:663.1

#### IMMUNOBIOLOGICAL CHARACTERISTIC OF TETANUS TOXOID FRACTIONS BEFORE AND AFTER EXPOSURE TO ULTRASONIC WAVES

Babych Ye.M., Kalinichenko S.V., Ryabovol E.V., Kivva F.V., Ryzhkova T.A., Sklyar N.I., Kovalenko O.I., L.A., Plugator T.N., Eglit V.A., Bilozerskii V.I.

Fractional composition of industrial tetanus toxoid before and after exposure to ultrasonic waves was determined with the use of gel filtration chromatography. It was established, that with the exception of specific antigenic structures (fraction A), tetanus toxoid contained ballast proteins (fraction B). Ultrasound treatment of tetanus toxoid resulted in ballast proteins quantity decrease. Percentage composition of tetanus toxoid fractions depended on ultrasound treatment conditions.

**Key words:** tetanus toxoid, chromatography, ultrasound.