

УДК: 577.112+576.314.6+577.354.9+57.086.164

ТОКСИННЕЙТРАЛІЗУЮЧІ ВЛАСТИВОСТІ АНТИТІЛ ДО РЕКОМБІНАНТНИХ СУБОДИНИЦЬ А І В ДИФТЕРІЙНОГО ТОКСИНУ ТА НОВИЙ МЕТОД ЇХНЬОЇ ОЦІНКИ

А. А. КАБЕРНЮК, О. С. ОЛІЙНИК, Д. В. КОЛИБО, С. В. КОМІСАРЕНКО

Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України, Київ;
e-mail: akabernyuk@biochem.kiev.ua

Рівень токсиннейтралізуючих антитіл у крові хворого значною мірою визначає розвиток ускладнень при дифтерії. З метою профілактики цього захворювання проводять активну імунізацію населення дифтерійним анатоксином, а для лікування використовують пасивну імунізацію антитоксичною сироваткою коня. Дифтерійний анатоксин, що використовують у складі вакцинних препаратів, має низку суттєвих недоліків, пов'язаних, передусім, зі складною процедурою його одержання. Тому пошук і розроблення нових антигенних субстанцій, які здатні ефективно стимулювати протективну гуморальну відповідь, є актуальним завданням. Крім того, важливим є розроблення нових методів оцінки токсиннейтралізуючих властивостей як поліклональних, так і моноклональних антитіл, що дозволило б уникнути використання чутливих до токсину лабораторних тварин і препаратів активного дифтерійного токсину.

Нами проведено порівняльне дослідження можливості індукції токсиннейтралізуючих антитіл у тварин, імунізованих неактивними рекомбінантними субодинами А і В дифтерійного токсину. Для оцінки здатності цих антитіл інгібувати зв'язування токсину з чутливими клітинами лінії Vero запропоновано використовувати В-субодинацію дифтерійного токсину, мічену підсиленням зеленим флуоресцентним протеїном EGFP. Шкірний тест, що традиційно використовується для аналізу наявності протективних антитоксичних антитіл у сироватці, та розроблений нами підхід із використанням проточної цитометрії, показали здатність рекомбінантної субодинами В індукувати синтез токсиннейтралізуючих антитіл у лабораторних тварин (кролів і морських свинок).

Результати наших дослідів свідчать про перспективність використання рекомбінантної субодинами В дифтерійного токсину для одержання протективної імунної відповіді, а запропонований етичний і безпечний тест для її оцінки може замінити традиційні методи.

Ключові слова: дифтерія, токсиннейтралізуючі антитіла, проточна цитофлуорометрія, протективний імунітет, рекомбінантні субодинами дифтерійного токсину, флуоресцентний зонд, метод оцінки рівня протективних антитіл.

Дифтерія – гостре інфекційне захворювання, що характеризується запаленням слизових оболонок зів, гортані та ураженням систем внутрішніх органів внаслідок загальної інтоксикації. Найчастіше ця хвороба вражає дітей віком 4–6 років. Збудником захворювання є *Corynebacterium diphtheriae*, а основним чинником патогенності – дифтерійний токсин, який цей мікроорганізм виділяє у разі потрапляння до організму людини [1]. Дифтерійний токсин (ДТ) – це протеїновий екзотоксин масою 58,36 кДа, що належить до родини АВ-токсинів згідно із загальноприйнятою структурною класифікацією токсинів [2], і складається із двох (А і В) субодинами.

До складу А субодинами (SbA) токсину входить каталітичний домен, який здатний АДФ-рибозилувати амінокислотний залишок дифт-

аміду (модифікованого залишку гістидину) фактора елонгації трансляції eEF2, що призводить до зупинки синтезу протеїну. Субодина В (SbB) складається з рецепторзв'язуючого домену, що бере участь у взаємодії токсину з рецептором на поверхні клітини, та транслокуючого домену, завдяки якому субодина А потрапляє в цитозоль клітини. Таким чином, субодина В відповідає за зв'язування та транслокацію токсину у клітину, а субодина А – за його токсичну дію [3].

Наявність антитіл у крові проти ДТ може захистити організм від розвитку хвороби. Тому основним методом лікування дифтерії є пасивна імунізація, яку проводять гіперімунною сироваткою коня, очищеною сольовим фракціонуванням і пептичним розщепленням, внаслідок чого вона містить F(ab)'2 фрагменти антитіл (далі F(ab)'2) [4].

Після одержання у 1923 році Дж. Рамоном дифтерійного анатоксину [5] його стали широко використовувати для вакцинації проти дифтерійної інфекції. Анатоксин, що використовують для вакцинації у наш час, — нативний токсин, виділений з патогенного штаму *C. diphtheriae* Park-Williams 8, який пройшов інактивацію формаліном. На сьогодні дифтерійний анатоксин входить до складу низки комплексних вакцин, таких як АКДП (адсорбована коклюшно-дифтерійно-правцева), АДП (адсорбована дифтерійно-правцева) чи АДП-М (адсорбована дифтерійно-правцева мінімізована), імунізація якими проводиться згідно з національним календарем щеплень. Зараз, завдяки вакцинації населення, рівень захворюваності на дифтерію є відносно низьким, проте досі можливі спалахи хвороби — на кшталт епідемії 1991–1998 років внаслідок відмови населення від вакцинації на тлі відносного епідеміологічного благополуччя.

У разі вакцинації дифтерійним анатоксином гуморальна імунна відповідь формується до обох субодиниць дифтерійного токсину, але протективні властивості виявляють переважно антитіла до субодиниці В, оскільки саме в СООН-кінцевій ділянці ДТ розташована амінокислотна послідовність, що відіграє ключову роль у процесі взаємодії токсину з рецептором на поверхні клітини [6]. Антитіла до субодиниці А, як правило, не виявляють здатності інактивувати токсин. Слід зазначити, що хоча переважна більшість протидифтерійних антитіл за імунізації анатоксином це антитіла проти субодиниці В, однак підвищений рівень антитіл до субодиниці А у крові хворого може свідчити про розвиток інфекційного процесу [7].

Розвиток молекулярної біології та поява генно-інженерних методів сприяли створенню та впровадженню у практику рекомбінантних субодиничних вакцин з рекомбінантними протеїнами [8, 9]. Використання генно-інженерних підходів під час створення вакцин дозволяє зменшити собівартість антигенної субстанції, уникнути роботи з потенційно небезпечними мікроорганізмами та моделювати направленість розвитку імунної відповіді шляхом введення до складу вакцин лише тих антигенних детермінант, що здатні формувати протективний імунітет, або структур, що впливають на силу імунної відповіді.

Можливість замінити природний дифтерійний токсин на його нетоксичні рекомбінантні аналоги виглядає надзвичайно привабливо. Зважаючи на те, що продуцентом

рекомбінантних антигенів можна використовувати мікроорганізм *Escherichia coli*, виробництво вакцин буде простішим та безпечнішим.

У цій роботі за мету ми поставили встановлення принципової можливості використання одержаних нами раніше рекомбінантних аналогів А- і В-субодиниць дифтерійного токсину [10] для індукції синтезу токсиннейтралізуючих антитіл.

Класичним методом оцінки протективності гуморального протидифтерійного імунітету є шкірна проба Шика (Schick test) [11]. Під час постановки проби Шика токсин вводять внутрішньошкірно й через 48 год оцінюють діаметр еритеми, що утворилася. Цей метод, розроблений ще на початку ХХ ст., використовувався для оцінки протективного протидифтерійного імунітету. У другій половині ХХ ст. для оцінки протидифтерійного імунітету стали застосовувати внутрішньошкірний токсиннейтралізуючий тест: токсин разом із досліджуваною сироваткою вводили внутрішньошкірно чутливим до дифтерійного токсину тваринам (морські свинки, кролі тощо) [13]. Незважаючи на високу чутливість, ці методи мають суттєві недоліки, а саме: тривалий час проведення тесту та необхідність залучення до експериментальної роботи великої кількості лабораторних тварин для отримання статистично вірогідних результатів. Тому у світі проводяться роботи з валідації швидших та «гуманніших» методів оцінки кількості антитоксину. Сучасні методологічні підходи дозволяють оцінити протективність антитіл без залучення в експеримент чутливих до дифтерійного токсину тварин. Натомість можна використовувати клітинні лінії, одержані з організмів, що є чутливими до дифтерійного токсину, або імунохімічні методи [13, 14]. Однак більшість з цих методів потребує використання активного токсину, що вимагає відповідних заходів біобезпеки під час проведення експериментів. Тому одним із завдань цієї роботи було розроблення нового методу оцінки токсиннейтралізуючих властивостей антитіл у тесті інгібування зв'язування нетоксичних флуоресцентних похідних рекомбінантної В-субодиниці з чутливими до ДТ клітинами.

Матеріали і методи

Імунізація тварин. Тварин імунізували введенням антигену внутрішньом'язово в задню поверхню стегна; перший раз — з повним, наступні рази — з неповним ад'ювантом Фройнда; інтервал між імунізаціями — 14 днів. Для імунізації морських свинок одноразова доза

антигену на тварину складала 100 мкг, для імунізації кролів – 125 мкг.

Визначення титру антитіл в імунних сироватках методом імуноензиматичного аналізу. Антигени, розведені у ЗФР (забуферений фізіологічний розчин, який містив 0,8% NaCl, 0,25% KCl, 0,144% Na₂HPO₄ та 0,024% KН₂PO₄, рН 7,2) до концентрації 5 мкг/мл, вносили по 100 мкл на лунку. Сироватки у відповідних розведеннях вносили у ТФБ (ЗФР з додаванням 0,04% твіну-20). Для виявлення сироваткових антитіл використовували кон'югат протеїну А з пероксидазою хрому, який також вносили у ТФБ по 100 мкл на лунку. Усі розчини інкубували протягом години при 37 °С. Перед внесенням наступного розчину вміст лунок видаляли, а лунки тричі промивали. Як хромоген-субстрат використовували ортофеніллендіамін. Через 20 хв після внесення розчину субстрату реакцію зупиняли внесенням 50 мкл розчину 2 М сірчаної кислоти в кожен лунку. Результати вимірювали за допомогою плашкового спектрофотометра за довжини хвилі 490 нм.

Шкірна проба – визначення мінімальної реактивної дози дифтерійного токсину. Мінімальну реактивну дозу визначали як кількість токсину, що здатна спричинити еритему діаметром 1 см за внутрішньошкірного введення після 48 год від моменту введення. Дифтерійний токсин (люб'язно наданий професором Ю. Л. Радавським, Інститут біоорганічної хімії та нафтохімії НАН України) вводили внутрішньошкірно в 100 мкл 0,2%-го желатину у ЗФР, рН 7,4, в різних розведеннях. У разі постановки такого тесту кількість дифтерійного токсину, що вводиться, виражається розведенням летальної дози токсину. Для визначення мінімальної реактивної дози різні розведення ДТ вводили тваринам внутрішньошкірно й через 48 год вимірювали діаметр еритеми.

Для дослідження протективних властивостей сироваток імунізованих тварин мінімальну реактивну дозу токсину в 0,2%-му желатині в забуференому фізіологічному розчині, рН 7,4, попередньо інкубували протягом години при 37 °С з інактивованими (прогріванням при 56 °С) сироватками тварин.

Культивування клітин Vero. Клітинна лінія Vero, яка походить з епітелію нирки зеленої макаки (*Cercopithecus aethiops*), була отримана з банку клітинних ліній Інституту експериментальної патології, онкології та радіобіології ім. Р. Є. Кавецького НАН України. Клітини культивували на поживному середовищі RPMI-1640 з L-глутаміном, 50 мг/л цефало-

тину та з додаванням фетальної сироватки корови до кінцевої концентрації 10% (Sigma, США).

Експресія і виділення рекомбінантних протеїнів. Експресію рекомбінантних протеїнів проводили у штамі *E. coli* Rosetta (DE3). Бактеріальну культуру нарощували при 37 °С в умовах сильної аерації (250 об./хв) до значення оптичної густини A₆₀₀ – 0,5–0,7 в середовищі 2YT (на 1 л: 17 г бактотриптон, 10 г дріжджового екстракту, 5 г NaCl), яке містило 50 мг/л канаміцину та 170 мг/л хлорамфеніколу. Експресію протеїну індукували додаванням ізопропіл-β-D-тіогалактопіранозиду (IPTG; Fermentas, Литва) до концентрації 1 мМ. Після індукції експресії культуру інкубували 3,5 год при 30 °С в умовах сильної аерації (250 об./хв), після чого клітини осаджували центрифугуванням.

Рекомбінантні протеїни виділяли методом метал-афінної хроматографії на колонці з афінним сорбентом – Ni²⁺-NTA-агарозою (Sigma). Колонку з афінним сорбентом врівноважували буфером W (50 мМ Na₂HPO₄, 0,5 М NaCl, 10 мМ імідазол) з 8 М сечовиною. Клітини, осаджені з 10 мл бактеріальної культури, ресуспендували в 1 мл буфера лізису (50 мМ Na₂HPO₄, 0,3 М NaCl, 10 мМ β-меркаптоетанол, 8 М сечовина) та соніфікували на ультразвуковому дезінтеграторі LabsonicM (Sartorius, ФРН). Клітинний дебрис осаджували центрифугуванням при 10 000 g 15 хв, а супернатант наносили на колонку.

Для виділення SbA та SbB для імунізації тварин протеїн елюювали буфером E (50 мМ Na₂HPO₄, 0,5 М NaCl, 400 мМ імідазол) з 8 М сечовиною.

Під час виділення рекомбінантного протеїну EGFP-SbB додатково проводили ренатурацію протеїну на колонці ступінчастим зниженням концентрації сечовини (8 М → 6 М → 4 М → 2 М → 0 М) у буфері W, яким промивали колонку. Протеїн елюювали буфером E.

Чистоту одержаного продукту оцінювали методом електрофорезу в 10%-му ДСН-ПААГ за [15]. Концентрацію виділеного протеїну визначали методом денситометрії електрофореграм за допомогою програми TotalLab 2.0 Nonlinear Dynamics та методом Бредфорд [16].

Проточна цитофлуориметрія. Клітини знімали з поверхні флакону, в якому їх культивували, 10 мМ розчином ЕДТА у ЗФР. Зв'язування з EGFP-SbB проводили впродовж 30 хв при 4 °С у ЗФР з 1% сироваткового альбуміну бика та 0,1% азиду натрію. Для приготування однієї проби брали 3·10⁵ клітин. Протеїн, що не зв'язався із клітинами, відмивали ЗФР.

При дослідженні наявності протективних антитіл EGFP-SbB попередньо інкубували у ЗФР з 1% сироваткового альбуміну бика та 0,1% азиду натрію із сироваткою крові або препаратом F(ab)'2 фрагментів антитіл коня протягом 1 год при 37 °С.

Для визначення інтенсивності флуоресценції клітин використовували проточний цитофлуориметр Coulter Epics XL (Beckman Coulter, США). Кількість подій, які реєстрував прилад під час кожного вимірювання, становила 5000. Аналіз даних, отриманих проточним цитофлуориметром, проводили за допомогою програми FCS Express v3.0. На основі цих даних розраховували розподіл клітин за прямим та боковим світлорозсіюванням, яке характеризує морфологію клітин, та розподіл інтенсивності флуоресценції за каналом FL1 Log.

Результати та обговорення

Дослідження імуногенних властивостей рекомбінантних субодиниць дифтерійного токсину. Імуногенні властивості рекомбінантних субодиниць дифтерійного токсину вивчали на чутливих до дифтерійного токсину тваринах – морських свинках і кролях. Тварин було поділено на три групи: 1) контрольна група; 2) група, яку імунізували субодиницею А; 3) група, яку імунізували субодиницею В. У контрольній групі було дві морські свинки та один кроль; у групах, які імунізували, було по три свинки та по два кролі в кожній. Імунізацію тварин (морських свинок та кролів) проводили за стандартною схемою імунізації: три імуніза-

ції з перервами між імунізаціями 14 днів; антиген вводили в задню частину стегна.

Титри антитіл визначали методом імуноензиматичного аналізу. Для виявлення сумарних імуноглобулінів морської свинки та кроля використовували кон'югат протеїну А з пероксидазою хрому, одержаний періодатним методом за Р. К. Nakane [17]. Показано, що імуногенність субодиниці В значно вища, ніж субодиниці А. Титр антитіл у морських свинок, імунізованих рекомбінантною субодиницею А, складає 1 : 1 600, в той час, як у імунізованих рекомбінантною субодиницею В, він більший ніж 1 : 6 400. Аналогічний результат отримали за імунізації кролів рекомбінантними субодиницями. Титри антитіл до рекомбінантних субодиниць А та В склали 1 : 400 та 1 : 16 000 відповідно. Одержані результати добре корелюють із літературними даними, згідно з якими субодиниця А виявляє менші імуногенні властивості порівняно з субодиницею В дифтерійного токсину [18]. Разом з тим слід зазначити, що молекулярна маса субодиниці А (21,1 кДа) менша, ніж маса субодиниці В (37,1 кДа), що також може впливати на ефективність розвитку імуноної відповіді.

Оцінка здатності рекомбінантних субодиниць ДТ формувати протективний імунітет. Мінімальну реактивну дозу встановлювали для кожної нової партії стокового розчину ДТ, що було використано в роботі. З етичних міркувань ми не встановлювали летальну дозу для ДТ, який було використано в роботі (для встановлення летальної дози ДТ за М. F. Barile

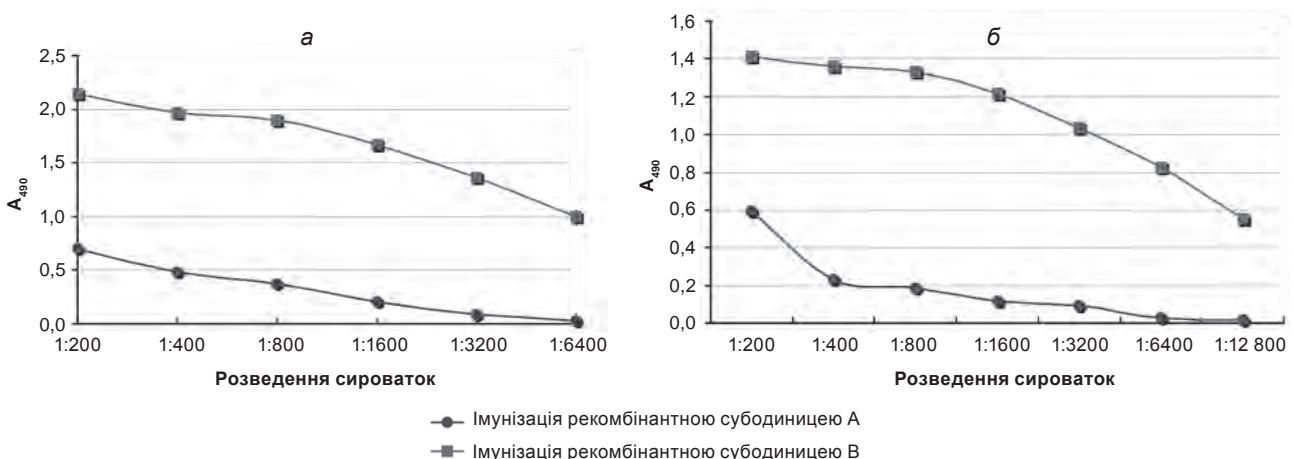


Рис. 1. Імуноензиматичне дослідження сироваток тварин імунізованих рекомбінантними субодиницями А і В дифтерійного токсину: а – у морських свинок; б – у кролів. Титри антитіл у сироватках крові тварин, імунізованих рекомбінантною субодиницею В, виявилися вищими ніж у тварин, імунізованих субодиницею А

необхідно протестувати декілька розведень токсину на групах тварин (в кожній групі по 8) й встановити ту мінімальну дозу, що здатна спричинити смерть принаймні 75% тварин у групі через 60–120 год після введення), а користувалися літературними даними, згідно з якими мінімальна летальна доза для морської свинки складає 100 нг/кг маси тіла тварини [19, 20]. Нами було проведено тестування токсину й показано, що мінімальна реактивна доза складає 1/40–1/80 від мінімальної летальної дози залежно від партії стокового розчину ДТ.

Термін «протективний імунітет» в дифтерії означає наявність в сироватці крові антитіл, що здатні нейтралізувати дифтерійний токсин. Всі методи, які використовуються для визначення наявності токсиннейтралізуючих антитіл, можна розділити на дві групи, а саме: методи з використанням чутливих до дифтерії тварин (як правило, це морські свинки чи кролі) та методи без залучення тварин до експерименту.

Нами було використано обидва підходи, причому для тестування протективності антитіл без застосування лабораторних тварин ми запропонували новий підхід, що базується на методі проточної цитофлуорометрії та не потребує використання активного дифтерійного токсину.

Під час роботи з тваринами ефективність використання рекомбінантних субодиноць ДТ для формування протективного протидифтерійного імунітету оцінювалася за токсиннейтралізуючою активністю імунних сироваток та шляхом порівняння результатів шкірної проби на імунізованих та інтактних тваринах.

Для оцінки антитоксичних властивостей сироваток імунізованих тварин досліджували сироватки вводили внутрішньошкірно інтактній морській свинці разом із мінімальною реактивною дозою дифтерійного токсину. Для цього сироватки імунізованих субодиноцями А та

В тварин у розведенні 1 : 1000 було попередньо проінкубовано з токсином протягом 1 год при 37 °С. Як позитивний контроль тваринам було введено таку саму дозу токсину без додавання сироваток.

Було показано, що сироватки тварин, імунізованих субодиноцею В, виявляють протективні властивості і в розведенні 1 : 1000 майже повністю нейтралізують мінімальну реактивну дозу токсину. У той же час сироватки тварин, імунізованих субодиноцею А, такі властивості не виявляють, і розмір еритем фактично не відрізняється від розміру еритем контрольної проби (табл. 1).

Крім того, наявність протективного імунітету оцінювали шляхом порівняння розміру еритем після шкірної проби в імунізованих різними субодиноцями та інтактних тварин. Було показано, що у разі введення кролям, імунізованим субодиноцею В, мінімальної реактивної дози, що становила 1/40 від летальної дози, дифтерійного токсину еритема не проявляється. На тваринах, імунізованих субодиноцею А, та у групі інтактних тварин вірогідної різниці у розмірі утворених еритем не спостерігається (табл. 2).

Разом з тим аналогічний тест на морських свинках не дозволив виявити вірогідної різниці в розмірах еритем між групами тварин, імунізованих різними субодиноцями (табл. 3). Одержані дані можуть бути обумовлені фізіологічними відмінностями різних видів тварин, а саме — підвищеною чутливістю морських свинок до сенсibiliзації протеїновими антигенами, або іншими об'єктивними обставинами, що ускладнюють інтерпретацію результатів шкірної проби [21].

Цитофлуорометричне дослідження здатності антитіл перешкоджати зв'язуванню В-субодиноці токсину з поверхнею клітин лінії Vero in vitro. Раніше нами було показано принципову можливість використання проточної цитофлуорометрії з метою дослідження взаємодії

Таблиця 1. Результати шкірного тесту на морських свинках із введенням ДТ, попередньо інкубованого із сироватками імунізованих тварин

Групи дослідних тварин	Діаметр еритеми, мм		
	Проба 1	Проба 2	Середнє значення
1/80 ЛД	10	9	9,5
1/80 ЛД + сироватка тварини, імунізованої субодиноцею А, в розведенні 1 : 1000	12,5	10	11,3
1/80 ЛД + сироватка тварини, імунізованої субодиноцею В, в розведенні 1 : 1000	4	0	2

Таблиця 2. Оцінка протективного імунітету кролів, імунізованих рекомбінантними субодинамиціями дифтерійного токсину, за допомогою шкірної проби

Групи тварин	Діаметр еритеми, мм				
	Проба 1	Проба 2	Проба 3	Проба 4	Середнє значення
Контрольна	27	25			26
Імунізація субодинамицею А	19	21	20	20	20
Імунізація субодинамицею В	9	8	0	0	4

Таблиця 3. Оцінка протективного імунітету морських свинок, імунізованих рекомбінантними субодинамиціями дифтерійного токсину, за допомогою шкірної проби

Групи тварин	Діаметр еритеми (середнє значення), мм
Контрольна	20
Імунізація субодинамицею А	18
Імунізація субодинамицею В	15,5

рецептора дифтерійного токсину – НВ-EGF з рекомбінантними флуоресцентними похідними дифтерійного токсину [22].

Було встановлено, що рекомбінантна субодинамиця В дифтерійного токсину, злита з EGFP (підсиленім зеленим флуоресцентним протеїном), взаємодіє із клітинами лінії *Vero* дозозалежним чином. Концентрація насичення складає 1,46 мкМ протеїну, що відповідає 20 мкг протеїну на 200 мкл клітинної суспензії ($1,5 \cdot 10^6$ клітин/мл).

Відомо, що основний механізм дії протективних антитіл – блокування взаємодії ДТ з рецептором на поверхні клітин за рахунок зв'язування антитіл з В субодинамицею. Особливо важливою у процесі взаємодії ДТ з рецептором є С-кінцева ділянка (482–535) В-субодинамиці. Так, моноклональні антитіла, що взаємодіють із цією амінокислотною послідовністю, виявляють токсиннейтралізуючі властивості [23].

На нашу думку, оцінку наявності токсиннейтралізуючих антитіл у сироватці тварин можна провести за допомогою проточної цитофлуориметрії з використанням EGFP-SbB. У разі присутності токсиннейтралізуючих антитіл у сироватці крові імунізованих тварин попередня інкубація сироватки з EGFP-SbB має призводити до зменшення інтенсивності флуоресценції клітин, що буде свідчити про блоку-

вання взаємодії субодинамиці В із рецептором на поверхні клітин.

Спочатку нами було встановлено мінімальну кількість EGFP-SbB, що за взаємодії із клітинами дає вірогідно відмінний сигнал порівняно з автофлуоресценцією клітин у контролі. На рис. 2 представлено дані, одержані за титрування EGFP-SbB. Для виконання подальшої роботи ми обрали кількість EGFP-SbB, що відповідає 2 мкг на 200 мкл суспензії клітин.

Титрування сироватки кроля, імунізованого субодинамицею В, та препарату F(ab)'2 фрагментів антитіл коня показали, що зі збільшенням кількості сироватки спостерігається зменшення сигналу, що свідчить про наявність антитіл, які здатні блокувати взаємодію EGFP-SbB із рецептором на поверхні клітин. Вірогідну різницю в інтенсивності флуоресценції можна спостерігати у разі збільшення кількості сироватки, що брали для блокування EGFP-SbB, з 3 до 6 мкл (рис. 3).

Для підтвердження специфічного блокування взаємодії EGFP-SbB із рецептором було проведено дослід із використанням сироваток, отриманих від імунізованих рекомбінантними субодинамиціями кролів, та неімунної тварини (рис. 4). Сироватку від неімунної тварини використовували для того, щоб переконатись, що зменшення інтенсивності сигналу, яке ми спостерігали в попередньому досліді, зумовлено саме наявністю в сироватці антитіл до субодинамиці В, а не чинниками неспецифічного імунітету, такими як: природні поліспецифічні імуноглобуліни, протеїни гострої фази, комплекс тощо. Кожну сироватку і препарат F(ab)'2 фрагментів антитіл коня було взято в кількості 6 та 3 мкл, оскільки саме в цьому діапазоні ми спостерігали найбільшу зміну інтенсивності флуоресценції в попередньому досліді.

Дані проточної цитофлуориметрії було оброблено за допомогою програми FCS Express 3. Під час проведення розрахунків використовували значення медіани інтенсивності флуорес-

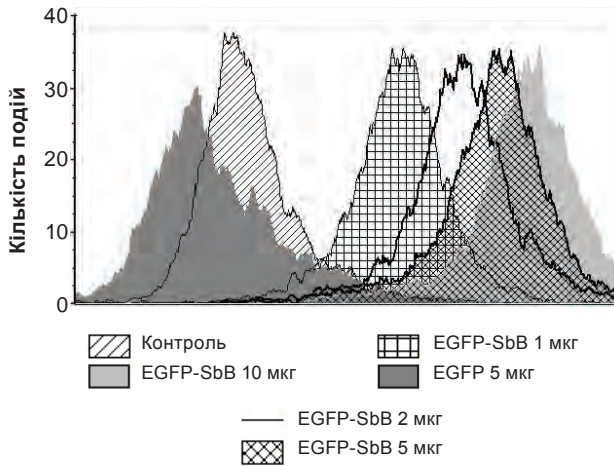


Рис. 2. Титрування кількості EGFP-SbB. Порівняльна гістограма інтенсивності флуоресценції препаратів клітин після забарвлення різною кількістю EGFP-SbB

ценції клітин (ця величина найбільш адекватно виражає інтенсивність флуоресценції певної популяції клітин у разі оброблення даних, одержаних за допомогою проточної цитофлуориметрії). Зміну інтенсивності флуоресценції клітин виражали у відсотках. За сто відсотків взято інтенсивність флуоресценції клітин позитивного контролю (клітин, що інкубували лише з EGFP-SbB).

Попередня інкубація EGFP-SbB із 6 та 3 мкл сироватки кроля, імунізованого субодиноцею В, порівняно з контролем зменшувала інтенсивність флуоресценції на 79 та 65% відповідно. Передінкубація з такою самою кількістю сироватки кроля (6 і 3 мкл), імунізованого субодиноцею А, знижує сигнал лише на 21 та 8%. Незначне зменшення сигналу також спостерігається у пробах, попередньо інкубованих із контрольною сироваткою – 23 та 19% відповідно. Ймовірно, зменшення інтенсивності флуоресценції у пробах, що попередньо були інкубовані із сироваткою кроля, імунізованого субодиноцею А, та з контрольною сироваткою, зумовлено наявністю неспецифічних факторів захисту, тоді як значне зменшення сигналу у пробах, попередньо інкубованих із сироваткою тварини, імунізованої субодиноцею В, свідчить про специфічне блокування взаємодії EGFP-SbB із рецептором на поверхні клітин.

Одержані результати підтверджують здатність сироватки крові тварини, імунної до В-субодиноці ДТ, специфічно блокувати взаємодію EGFP-SbB із клітинами лінії Vero.

Таким чином, нами показано, що рекомбінантний аналог субодиноці В так само, як

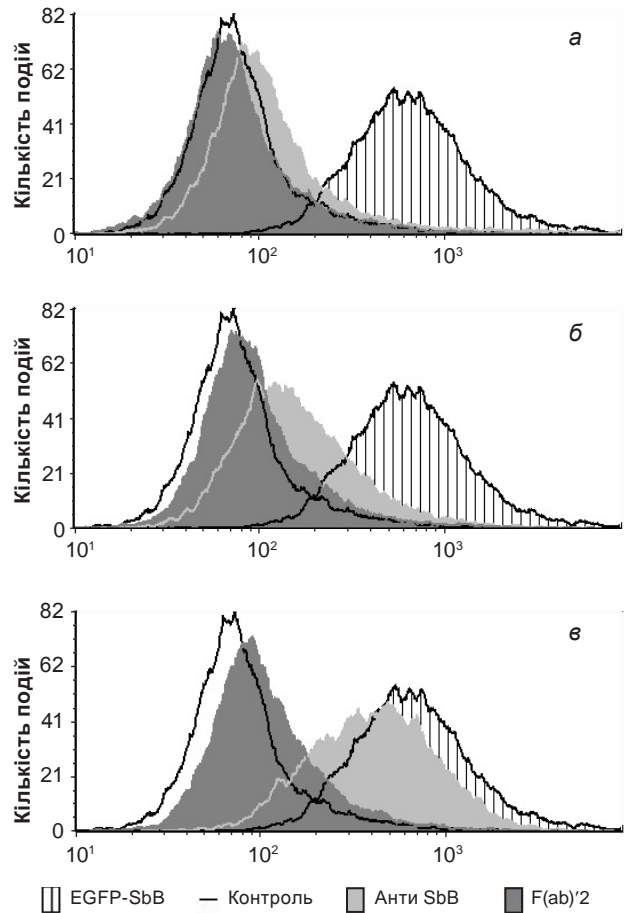


Рис. 3. Порівняльні гістограми інтенсивності флуоресценції препаратів клітин лінії Vero після забарвлення препаратами EGFP-SbB, попередньо інкубованими з різною кількістю сироватки кроля, імунізованого рекомбінантною субодиноцею В дифтерійного токсину: а) 12 мкл сироватки; б) 6 мкл сироватки; в) 3 мкл сироватки. Як позитивний контроль використовували клітини, забарвлені EGFP-SbB, а негативний – незабарвлені клітини, і клітини, забарвлені EGFP-SbB у присутності F(ab)'2 фрагментів антитіл із протидифтерійної сироватки коня в аналогічній кількості: а) 12 мкл; б) 6 мкл; в) 3 мкл сироватки (1 мкл сироватки містить 10 МО антитіл)

і субодиноця В природного токсину, виявляє вищу імуногенність порівняно із субодиноцею А. Титри антитіл тварин, імунізованих рекомбінантною субодиноцею А, значно менші порівняно з титрами антитіл тварин, імунізованих рекомбінантною субодиноцею В.

За результатами шкірної проби еритеми у тварин, які були імунізовані рекомбінантною субодиноцею В були зменшені, що свідчить про здатність рекомбінантного антигену формувати протективну гуморальну відповідь.

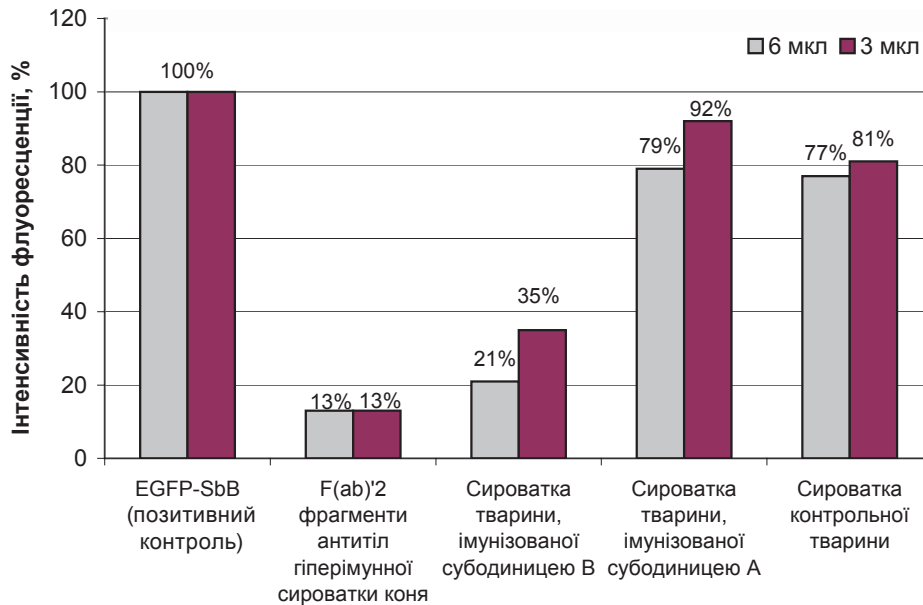


Рис. 4. Дані проточної цитофлуориметрії, які свідчать, що сироватка тварини, імунізованої субодиноцею В дифтерійного токсину, та F(ab)2 фрагменти протидифтерійних антитіл коня здатні специфічно блокувати взаємодію EGFP-SbB з клітинами лінії Vero на відміну від сироваток контрольної тварини та тварини імунізованої субодиноцею А (підписи на малюнку)

Отже, нами показано принципову можливість використання рекомбінантної субодиноци В дифтерійного токсину для імунізації з метою одержання токсиннейтралізуючих антитіл. Токсиннейтралізуючі властивості сироваток тварин, імунізованих субодиноцею В, підтверджено результатами класичної шкірної проби за введення антитіл разом із мінімальною реактивною дозою дифтерійного токсину. Крім того, нами запропоновано «гуманний» та безпечний метод оцінки токсиннейтралізуючих властивостей антитіл, який полягає в інгібуванні зв'язування флуоресцентного похідного В-субодиноци дифтерійного токсину з чутливими до ДТ клітинами. Запропонований тест може знайти застосування не тільки в експериментальній роботі, наприклад, для скринінгу панелі моноклональних антитіл, але й для тестування імуногенності протидифтерійних вакцин і як рутинна процедура – для визначення вмісту протидифтерійних антитіл у препаратах комерційних сироваток.

Одержані дані дають підстави для подальшого дослідження можливості створення рекомбінантної вакцини проти дифтерії. На відміну від природного дифтерійного токсину, рекомбінантна В-субодиноця не містить каталітичного домену А, а отже не виявляє токсичні властивості. Порівняно з дифтерійним анатоксином, антигенна структура якого змінена обробленням формальдегідом, реком-

бінантна В-субодиноця дифтерійного токсину не зазнає аналогічної модифікації. Тому саме у структурі її молекули можна очікувати точніше відображення антигенних властивостей протективних епітопів. Крім того, виробництво рекомбінантного протеїнового препарату дешевше і безпечніше, ніж його природного аналога. Безумовно, валідація рекомбінантних аналогів ДТ для заміни існуючих вакцин потребує достатньо великого часу, але такі препарати швидше можуть замінити дифтерійний анатоксин, який зараз використовують для одержання терапевтичних протидифтерійних сироваток коня.

ТОКСИННЕЙТРАЛІЗУЮЩІЕ СВОЙСТВА АНТИТЕЛ ПРОТИВ РЕКОМБІНАТНЫХ СУБЪЕДИНИЦ А И В ДИФТЕРИЙНОГО ТОКСИНА И НОВЫЙ МЕТОД ДЛЯ ИХ ОЦЕНКИ

А. А. Кабернюк, Е. С. Олейник,
Д. В. Колибо, С. В. Комисаренко

Институт биохимии им. А. В. Палладина
НАН Украины, Киев;
e-mail: akabernyuk@biochem.kiev.ua

Уровень токсиннейтралізующих антител в крови больного в значительной мере определяет развитие осложнений при дифтерии. С целью профилактики этого заболевания

проводят активную иммунизацию населения дифтерийным анатоксином, а для лечения используют пассивную иммунизацию антитоксической лошадиной сывороткой. Дифтерийный анатоксин, входящий в состав вакцинных препаратов, имеет ряд существенных недостатков, связанных, прежде всего, со сложной процедурой его получения. Поэтому поиск новых антигенных субстанций, которые способны эффективно стимулировать протективный гуморальный ответ, является актуальной задачей при создании противодифтерийных вакцин. Кроме того, важной задачей является разработка новых методов для оценки токсиннейтрализующих свойств как поликлональных, так и моноклональных антител, которые позволили бы избежать использования чувствительных к дифтерийному токсину животных и препаратов активного дифтерийного токсина.

Нами проведено сравнительное исследование возможности индукции токсиннейтрализующих антител у животных, иммунизированных неактивными рекомбинантными субъединицами А и В дифтерийного токсина. Для оценки способности этих антител ингибировать связывание токсина с чувствительными клетками линии *Vero* предложено использовать субъединицу В дифтерийного токсина, меченную усиленным зеленым флуоресцентным протеином EGFP. Кожная проба, которая традиционно используется для анализа наличия протективных антитоксических антител в сыворотке крови, и разработанный нами подход с использованием проточной цитометрии, показали способность рекомбинантной дифтерийной субъединицы В индуцировать синтез токсиннейтрализующих антител у лабораторных животных (кролей и морских свинок).

Результаты наших опытов свидетельствуют о перспективности использования рекомбинантной субъединицы В дифтерийного токсина для получения протективного иммунного ответа, а предложенный этичный и безопасный тест для его оценки может заменить традиционные методики.

Ключевые слова: дифтерия, токсиннейтрализующие антитела, проточная цитофлуорометрия, протективный иммунитет, рекомбинантные субъединицы дифтерийного токсина, флуоресцентный зонд, метод оценки уровня протективных антител.

TOXIN-NEUTRALIZING PROPERTIES OF ANTIBODIES TO DIPHTHERIA TOXIN RECOMBINANT SUBUNITS A AND B AND A NEW METHOD OF THEIR ESTIMATION

A. A. Kaberniuk, O. S. Oliinyk, D. V. Kolibo, S. V. Komisarenko

Palladin Institute of Biochemistry, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv;
e-mail: akabernyuk@biochem.kiev.ua

S u m m a r y

Development of complications during diphtheria depends to a large extent on toxin-neutralizing antibodies level in the patient's blood. Active immunization of people with diphtheria anatoxin is widely used for diphtheria prevention and passive immunization with hyperimmune antitoxic horse serum is used for diphtheria treatment. A traditional component of anti-diphtheria vaccines – diphtheria anatoxin has a number of serious disadvantages, which are mainly associated with complicated procedure of its production. Thus, the search for new antigen substances, which can effectively stimulate protective humoral response to diphtheria toxin, is an urgent task in anti-diphtheria vaccine development. Furthermore, one of the most important objects is the development of new in vitro methods for estimation of diphtheria toxin-neutralizing polyclonal and monoclonal antibodies, which allow to avoid using active diphtheria toxin and toxin-sensitive laboratory animals.

Comparative studies of toxin-neutralizing antibodies induction after immunization of laboratory animals with recombinant subunits A and B of diphtheria toxin were carried out. The new method for detection of protective antibodies in serum was proposed. This method is based on the ToBI test (Toxin Binding Inhibition test); namely on the property of anti-diphtheria antibodies to inhibit the binding of toxin subunit B fused with enhanced green fluorescent protein (EGFP) to the sensitive to diphtheria toxin *Vero* cells. The ability of subunit B to induce toxin-neutralizing antibodies in laboratory animals (rabbits and guinea pigs) was confirmed by the intradermal test, which is traditionally used to detect protective antitoxic antibodies in the serum, and by flow cytometry method, developed for this purpose.

The results suggest that diphtheria toxin recombinant subunit B may be used for the induction of the protective immune response. The new developed approach for estimation diphtheria toxin-neutralizing antibodies is more ethical and safe and can substitute successfully the traditional methods.

Key words: diphtheria, toxin-neutralizing antibodies, flow cytometry, protective immunity, diphtheria toxin recombinant subunits, fluorescent probe, method for detection of protective antibodies.

1. Шлегель Г. Общая микробиология. — Москва: Мир, 1987. — 567 с.
2. Jeljaszewicz J., Wadstrom T. / Bacterial Toxins and Cell Membranes. — L.& N.Y.: Academic Press, 1978. — P. 445.
3. Здановский А. Г., Здановская М. В., Янковский Н. К. // Молекулярная генетика. — 1993. — № 1–2. — С. 3–10.
4. Покровский В. И., Пак С. Г., Брико Н. И., Данилкин Б. К. Инфекционные болезни и эпидемиология. 2-е изд. — Москва: ГЭОТАР-МЕДИА, 2007. — 816.
5. Moloney P. J. // Am. J. Public Health. — 1926. — **16**, N 12. — P. 1208–1210.
6. Rolf J. M., Eidels L. // Mol. Microbiol. — 1993. — **7**, N 4. — P. 585–591.
7. Романюк С. И., Колибо Д. В., Кавун Э. М. и др. // Укр. біохім. журн. — 2001. — **73**, № 6. — P. 73–76.
8. Singh S. R., Dennis V. A., Carter C. L. et al. // Vaccine. 2007. — **25**, N. 33. — P. 6211–6223.
9. Cassataro J., Pasquevich K. A., Estein S. M. et al. // Ibid. — N 22. — P. 4437–4446.
10. Кабернюк А. А., Олійник О. С., Редчук Т. А., та ін. // Доповіді Національної академії наук України. — 2008. — № 9. — С. 160–166.
11. Schick B. // Muenchen Med. Wchenschr. — 1931. — N 60. — P. 2608–2610.
12. Knigh P. A., Tilleray J., Queminet J. // Dev. Biol. Stand. — 1986. — N 64. — P. 25–32.
13. Miyamura K., Nishio S., Ito A. et al. // J. Biol. Stand. — 1974. — **2**, N 3. — P. 189–201.
14. Manghi M. A., Pasetti M. F., Brero M. L. et al. // Vaccine. — 1995. — **13**, N 6. — P. 597–601.
15. Schagger H., Von Jagow G. // Anal. Biochem. — 1987. — **166**, N 2. — P. 368–379.
16. Bradford M. M. // Ibid. — 1976. — **72**. — P. 248–254.
17. Nakane P. K., Kawaoi A. // J. Histochem. Cytochem. — 1974. — **22**, N 12. — P. 1084–1091.
18. Karakus R., Caglar K., Aybay C. // Clin. Microbiol. Infect. — 2007. — **13**, N 11. — P. 1065–1071.
19. Barile M. F., Kolb R. W., Pittman M. // Infect. Immun. — 1971. — **4**, N 3. — P. 295–306.
20. Gill D. M. // Microbiol. Reviews. — 1982. — **46**, N 1. — P. 86–94.
21. Niggemeyer H. // Zentralbl. Bakteriol. — 1955. — **164**, N 1–5. — P. 39–40.
22. Кабернюк А. А., Лабинцев А. Ю., Колибо Д. В. та ін. // Укр. біохім. журн. — 2009. — **81**, № 1. — P. 68–78.
23. Rolf J. M., Eidels L. // Infect. Immun. — 1993. — **61**, N 3. — P. 994–1003.

Отримано 27.04.2009