

Abstract

I. V. Yelyseyeva,
A. O. Doroshenko,
E. M. Babych,
L. A. Zhdamarova,
V. I. Belozerskij,
T. V. Gorbach,

SI "I. I. Mechnikov Institute of Microbiology and Immunology of NAMS of Ukraine", 14-16 Pushkinskaya str., Kharkov, Ukraine, 61057;

V. N. Karazin Kharkiv National University;

Kharkiv National Medical University

FLUORESCENT SPECTRUM FEATURES OF SAMPLES OF DIPHThERIAL TOXOID NATIVE PURIFICATION

Introduction: The functional properties of proteins are determined by their conformation structure, which is stabilized by two classes of strong bonds and a three classes of weak bonds. The diphtherial toxin is a protein molecule consisting of two mutually independent globular domains A and B, held together by disulfide bridges. Detoxification of diphtheria toxin is a process of breaking it's native three-dimensional conformation under the influence of formaldehyde and heat. Precedents of reversion of toxoid's toxicity are known. According to current regulations of national authorities there are no specific requirements to test this ability. So there is a need to attract special testing methods. Fluorimetry is widely used in studies of nucleic acids and proteins structure, dynamics and function. It's considered that changings of the intensity of glow and fluorescence maxima location should indicate an effect of some factor as the breaking cause of spatial configuration and change of biological properties of the protein as its consequences. The way to control detoxifying diphtheria toxin by determining fluorescence intensity is known in the literature.

Purpose: The aim of the study was to determine the characteristics of the fluorescence of various series of native purified diphtheria toxoid (NPDT).

Materials and Methods: The fluorimetry of four samples of NPDT made at the PJSC Pharmstandart-Biolek enterprise, on the Hitachi 850 fluorimeter was carried out. Results: Maximums of fluorescence in all the samples studied were in the range of excitation waves from 336 to 340 nm, typical for the fluorescence of proteins. The peak of emission level was recorded in the sample № 1 of NPDT, made in 2007 (395 conventional units), the minimum of fluorescence - in the sample № 4 made in 2015 (266 conventional units).

Discussion: As known from the literature the fluorescence intensity of untreated samples of diphtheria toxoid during and immediately after detoxification was much lower than our results for NPDT fluorescence intensity (from 12 to 26 conventional units), whereas the native diphtheria toxin was characterized by even lower emission levels (from 2 to 9 conventional units). Obviously, in the process of detoxification of diphtheria toxin and in further storage of toxoid denaturation process occurs in the protein molecules, which are shown in the loosening of the protein globules release tryptophan residues, which increases the intensity of fluorescence emission. The degree of denaturation is definitely related to the level of specific (immunogenic) activity of a sample of diphtheria toxoid. So if the activity is maintained, it is likely we are talking about the first denaturation step - functional transition within the native protein structure. At full unfolding of the amino acid chain of a protein the specific activity of diphtheria toxoid is obviously lost on that a relative in-

crease of the level of fluorescence emission of NPDT samples may indicate. In the case of unexplained quenching the fluorescence of the sample we can suggest the possibility of reversion to its toxicity. These data indicate that fluorimetry may be used for the monitoring of conformational changes in the samples of diphtheria toxoid and become a tool for the regulation of vaccine quality control through the introduction of demonstration of the dynamics of the fluorescence spectra in the production. Screening of the fluorescence spectra of turned out samples of toxoid in the process of storage can help to identify the series, the quality of which is in doubt.

Keywords: diphtherial toxoid, fluorimetry, fluorescence quenching, denaturation of protein, conformational changes.

Corresponding author: *babych_em@ukr.net*

Резюме

**І. В. Єлисеєва,
А. О. Дорошенко,
Є. М. Бабич,
Л. А. Ждамарова,
В. І. Білозерський,
Т. В. Горбач,**

*ДУ «Інститут мікробіології та імунології ім. І. І. Мечникова Національної академії медичних наук України», вул. Пушкінська, 14-16, Харків, Україна, 61057;
Харківський національний університет ім. В. Н. Каразіна;
Харківський національний медичний університет*

ВИЗНАЧЕННЯ ОСОБЛИВОСТЕЙ СПЕКТРА ФЛУОРЕСЦЕНЦІЇ ЗРАЗКІВ НАТИВНОГО ОЧИЩЕНОГО ДИФТЕРІЙНОГО АНАТОКСИНУ

Функціональні властивості білків визначаються їх конформаційною структурою, яка стабілізується двома класами сильних і трьома класами слабких зв'язків. Дифтерійний токсин – це білкова молекула, що складається з двох взаємно незалежних глобулярних доменів А та В, з'єднаних разом дисульфідними містками. Детоксикація дифтерійного токсину є процес руйнування його нативної тривимірної структури під впливом формальдегіду і високої температури. Відомі прецеденти реверсії токсичності анатоксину. Відповідно до діючих правил національних органів, не існує ніяких конкретних вимог для перевірки цієї можливості. Таким чином, існує необхідність залучення спеціальних методів тестування. У вивченні структури, динаміки і функції нуклеїнових кислот і білків широко використовується флуориметрія. Вважається, що зміна інтенсивності світіння і розташування максимумів флуоресценції може вказувати на дію якогось фактора як причини порушення просторової конфігурації білка і зміни біологічних властивостей білка, як сліdstва. Метою дослідження стало визначення спектрів флуоресценції різних серій нативного очищеного дифтерійного анатоксину (НОДА). Була проведена флуориметрія чотирьох зразків НОДА, виготовлених на підприємстві ПАТ «Фармстандарт-Біолік», з використанням флуориметра Hitachi 850. Максимуми флуоресценції в усіх досліджених нами зразках знаходилися у діапазоні поміж 330 і 345 нм, характерному для флуоресценції білків. Не виявлено очевидного впливу вміста білка в препараті на інтенсивність його флуоресценції. Максимальний пік флуоресценції виявлено у найдавнішому зразку № 1 від 2007 року (395 умовних одиниць), мінімальний рівень – у зразку № 4, виробленому у 2015 році (266 умовних одиниць). З даних літератури відомо, що інтенсивність флуоресценції неочищених зразків дифтерійного анатоксину в процесі та відразу після детоксифікації була на порядок нижчою за одержані нами показники інтенсивності світіння НОДА: від 12 до 26 умовних одиниць, тоді як нативний дифтерійний токсин характеризувався ще нижчим рівнем світіння: від 2 до 9 умовних одиниць. Очевидно, що в процесі трансформації дифтерійного токсину в анатоксин та подальшого його зберігання у білкових молекулах відбуваються дена-



тураційні процеси, які проявляються у розпушенні білкових глобул, вивільненні залишків триптофана, що підвищує інтенсивність флуоресцентного світіння. Ступінь денатурації безумовно пов'язана з рівнем специфічної (імуногенної) активності зразку дифтерійного анатоксину. Отже якщо активність зберігається, то ймовірно йдеться про першу стадію денатурації – функціональний перехід в межах нативної структури білка. При повному розгортанні амінокислотного білкового ланцюжку активність дифтерійного анатоксину вочевидь втрачається, на що може вказувати відносно підвищення рівню світіння зразків НОДА. У випадку неояснимого гасіння флуоресценції зразка можна припустити можливість реверсії його токсичності. Наведені дані свідчать про те, що флуориметрія може бути використана для моніторинга конформаційних змін зразків дифтерійного анатоксину і стати знаряддям для регуляції контролю якості вакцини шляхом впровадження у виробництво демонстрації динаміки спектрів флуоресценції. Скринінг спектрів флуоресценції напрацьованих виробничих зразків анатоксину в процесі їх зберігання може допомогти виявленню серій, якість котрих викликає сумніви.

Ключові слова: дифтерійний анатоксин, флуориметрія, гасіння флуоресценції, денатурація білка, конформаційні зміни.

Резюме

**И. В. Елисеєва,
А. О. Дорошенко,
Є. М. Бабич,
Л. А. Ждамарова,
В. И. Белозерский,
Т. В. Горбач,**

ГУ «Институт микробиологии и иммунологии им. И. И. Мечникова Национальной академии медицинских наук Украины», ул. Пушкинская, 14-16, Харьков, Украина, 61057;

Харьковский национальный университет им. В. Н. Каразина; Харьковский национальный медицинский университет

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ОСОБЕННОСТЕЙ СПЕКТРА ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ ОБРАЗЦОВ НАТИВНОГО ОЧИЩЕННОГО ДИФТЕРИЙНОГО АНАТОКСИНА

Функциональные свойства белков определяются их конформационной структурой, которая стабилизируется двумя классами сильных и тремя классами слабых связей. Дифтерийный токсин – это белковая молекула, состоящая из двух взаимно независимых глобулярных доменов А и В, соединенных вместе дисульфидными мостиками. Детоксикация дифтерийного токсина есть процесс разрушения его нативной трехмерной структуры под воздействием формальдегида и высокой температуры. Известны прецеденты реверсии токсичности анатоксина. В соответствии с действующими правилами национальных органов, не существует никаких конкретных требований для проверки этой возможности. Таким образом, существует необходимость привлечения специальных методов тестирования. В изучении структуры, динамики и функции нуклеиновых кислот и белков широко используется флуориметрия. Считается, что изменения интенсивности свечения и местоположения максимумов флуоресценции может указывать на действие какого-либо фактора как причины нарушения пространственной конфигурации белка и изменения биологических свойств белка, как следствия. Целью исследования стало определение спектров флуоресценции различных серий нативного очищенного дифтерийного анатоксина (НОДА). Была проведена флуориметрия четырех образцов НОДА, изготовленных на предприятии ОАО «Фармстандарт-Биолек», с использованием флуориметра Hitachi 850. Максимумы флуоресценции во всех исследованных образцах находились в диапазоне между 330 и 345 нм, характерном для флуоресценции белков. Не выявлено очевидного влияния содержания белка в препарате на интенсивность его флуоресценции. Максимальный пик флуоресценции



обнаружен в старейшем образце № 1 от 2007 года (395 условных единиц), минимальный уровень – в образце № 4, произведенном в 2015 году (266 условных единиц). Из данных литературы известно, что интенсивность флуоресценции неочищенных образцов дифтерийного анатоксина в процессе и сразу после детоксификации была на порядок ниже полученных нами показателей интенсивности свечения НОДА: от 12 до 26 условных единиц, тогда как нативный дифтерийный токсин характеризовался еще более низким уровнем свечения: от 2 до 9 условных единиц. Очевидно, что в процессе трансформации дифтерийного токсина в анатоксин и дальнейшего его хранения в белковых молекулах происходят денатурационные процессы, которые проявляются в разрыхлении белковых глобул, высвобождении остатков триптофана, что повышает интенсивность флуоресцентного свечения. Степень денатурации безусловно связана с уровнем специфической (иммуногенной) активности образца дифтерийного анатоксина. Так что если активность сохраняется, то вероятно речь идет о первой стадии денатурации – функциональном переходе в пределах нативной структуры белка. При полном разветывании аминокислотной белковой цепочки активность дифтерийного анатоксина очевидно теряется, на что может указывать относительное повышение уровня свечения образцов НОДА. В случае необъяснимого тушения флуоресценции образца дифтерийного анатоксина можно предположить возможность реверсии его токсичности. Приведенные данные свидетельствуют о том, что флуориметрия может быть использована для мониторинга конформационных изменений образцов дифтерийного анатоксина и стать орудием для регуляции контроля качества вакцины путем внедрения в производство демонстрации динамики спектров флуоресценции. Скрининг спектров флуоресценции наработанных производственных образцов анатоксина в процессе их хранения может помочь выявлению серий, качество которых вызывает сомнения.

Ключевые слова: дифтерийный анатоксин, флуориметрия, гашение флуоресценции, денатурация белка, конформационные изменения.

Автор, відповідальний за листування: babych_em@ukr.net

Вступ

Дифтерійний токсин секретується клітинами *Corynebacterium diphtheriae*, що містять генوم лізогенного бактеріофага β tox+, і є продуктом останнього. Дифтерійний токсин – це інтактний ковалентно-безперервний поліпептидний ланцюг, білкова молекула, що складається з двох незалежних один від одного глобулярних доменів А (від англ. active) і В (від англ. binding), скріплених дисульфідним містком. Токсин є потужним інгібітором білоксинтезуючої системи організму людини з каталітичним механізмом дії. С-термінальний домен В з молекулярною масою близько 37 кДа володіє лектинопохідною дією: він здатний специфічно зв'язуватися зі специфічним поверхневим рецептором

еукаріотичних клітин-мішеней та відповідає за транспортування субодиниці А у цитозоль. N-термінальна субодиниця А з молекулярною масою 21 кДа каталізує перенос АДФ-рибозильної групи НАД (нікотинамідаденіндинуклеотид) на фактор елонгації EF-2, блокує стадію транслокації елонгаційного циклу еукаріотичної рибосоми, зупиняє синтез білка та призводить до загибелі клітини [1; 2; 3].

Функціональні властивості білків взагалі, в тому числі й білкової молекули дифтерійного токсину, визначаються їх конформацією, просторовою структурою, яка стабілізується двома класами міцних зв'язків (пептидних, поміж карбоксильною та аміногрупою двох амінокислот, і дисульфідних) та великою кількістю слабких



зв'язків трьох класів (водневих, гідрофобних, електростатичних) [4; 5]. Унікальність конформації для кожного білка визначається його первинною структурою – послідовністю амінокислот у поліпептидному ланцюжку, здатністю груп пептидного зв'язку до водневих взаємодій: C=O...HN і положенням дисульфідних зв'язків. На основі первинної структури – послідовності амінокислот – спонтанно формуються вторинна і третинна структури рівнів конформації поліпептидного ланцюгу [5]. Вторинна структура – стеричний взаємозв'язок поміж розташованими близько один до одного вздовж ланцюжку амінокислотами. Вторинна структура може бути регулярною (α -спіраль, β -складчастий шар) або не виявляє жодних ознак регулярності (хаотичний клубок). Витки спіралі укріплюються водневими зв'язками, що виникли поміж карбоксильними групами та аміногрупами [4]. Третинна структура – укладання поліпептидних ланцюжків у глобули – виникає в результаті виникнення водневих, йонних, дисульфідних хімічних зв'язків і встановлення гідрофобних взаємодій поміж радикалами амінокислотних залишків, віддалених один від одного по ланцюжку. У водних розчинах гідрофобні радикали прагнуть сховатися від води, групуючись усередині глобули, в той час як гідрофільні радикали в результаті гідратації намагаються опинитися на поверхні молекули [4]. Для складних білків характерна четвертинна структура, яка утворюється двома чи більше глобулами, котрі утримуються у молекулі завдяки йонним, гідрофобним та електростатичним взаємодіям [4]. Субодиниця А дифтерійного токсину містить 10 % α -спіралей, 39 % β -структур та 51 % аперіодичних структур [2].

При зміні умов середовища, від яких ці сили залежать, відбувається денатурація – процес втрати тривимірної нативної конформації, властивій даній молекулі білка. Порушення нативної конформації молекули білка може відбуватися при зміні температури, йонної сили, рН, а також при обробці органічними або декотрими дестабілізуючими агентами, ультрафіолетовим опроміненням, важкими металами та їх солями, радіацією, тощо [4]. Детоксикація дифтерійного токсину здійснюється в результаті дії формальдегіду та високої температури, при цьому він втрачає здатність зв'язуватися з клітинами і ферментативну активність, але зберігає свою імуногенність, перетворюючись на анатоксин.

Денатуруючі речовини утворюють зв'язки з аміногрупами або карбонільними групами пептидного складу або декотрими бічними залишками амінокислот, підмінюючи власні внутрішньомолекулярні зв'язки у білка, внаслідок чого вторинна і третинна структури змінюються, але не зачіпають первинної структури. Зміна просторової конфігурації призводить до зміни властивостей білка та, як наслідок, робить неможливим виконання притаманних йому біологічних функцій [4].

При певних умовах денатурований білок може бути ренативований. Це відбувається при усуненні денатуруючого або дестабілізуючого фактору. Наприклад, при видаленні сечовини діалізом поліпептиди спонтанно відновлюють свою нативну конформацію. Те ж саме відбувається при повільному охолодженні денатурованого нагріванням білка [4].

В науковій літературі описані прецеденти реверсії процесу трансформації токсину в анатоксин [5, 6]. В експерименті була продемонстрована реверсія токсичності дифтерійного анатоксину шляхом розведення очищеного анатоксину і зберігання його при температурі 25 °C або 34 °C впродовж двох місяців; анатоксин при цьому був приготовлений шляхом детоксикації неочищених фільтратів культуральної рідини з формальдегідом з наступною очисткою [6]. Ці факти свідчать про те, що дифтерійний анатоксин після детоксифікації може стати токсичним в процесі зберігання при температурі, вищій за кімнатну.

Наведені дані доводять необхідність включення в контроль якості дифтерійного анатоксину тестування на перевірку реверсії його токсичності. Це особливо важливо у тропічних країнах, оскільки реверсія дуже швидко виникає при підвищених температурах. За сучасними правилами Національних органів управління не існує специфічних вимог для перевірки цієї можливості. Тестування специфічної нешкідливості дифтерійного анатоксину на виробництві регламентовані внутрішніми нормативними документами і відбувається, зазвичай, за допомогою двох тестів: визначення загальної токсичності на мурчаках та дермо-некротичної дії на кролях. Отже залучення інших, не біологічних, методів тестування мало б стати оперативним знаряддям перевірки якості дифтерійних вакцин та зменшити необхідність використання піддослідних тварин. Є також свідчення, що полагатися на шкірний тест на мурчаках для перевірки токсичності



чності анатоксину може бути небезпечним, оскільки були випадки, коли негативна шкірна реакція супроводжувалася проявами токсичності при системному введенні досліджуваних зразків [5]. І хоча механізм реверсії не встановлений, але можна припустити, що йдеться про конформаційні зміни білкових глобул.

Оперативним та чутливим методом дослідження структури, динаміки й функцій біологічних макромолекул – нуклеїнових кислот та білків стала флуориметрія, яка знайшла широке застосування в різних прикладних біологічних і біомедичних дослідженнях [7; 8; 9]. Цей метод використовує дослідження власної флуоресценції білків, обумовлених світінням триптофана, що і дає можливість оцінити конформаційний стан молекул білка.

Флуоресценція – це фізичне явище, суть якого полягає в короткочасному поглинанні кванта світла речовиною-флуорофором з наступною швидкою емісією другого кванта, котрий має властивості, відмінні від вихідного. Білки містять три амінокислотних залишки, котрі роблять основний внесок до власної флуоресценції білка (тирозин, фенілаланін, триптофан). Власна флуоресценція більшості білків обумовлюється, в першу чергу, триптофановими залишками. Для селективного збудження залишків триптофана використовується діапазон довжини хвиль 295–305 нм, в котрому поглинання тирозина і фенілаланіна мінімально [7]. Флуоресцентні властивості амінокислотного залишку триптофана є дуже чутливими до структурних перебудов макромолекули білка. Можливі два типи динамічних перебудов білкових глобул: перехід поміж двома функціонально активними формами (функціональний перехід) в межах нативної структури білка та перехід з нативного у денатурований функціонально неактивний стан (денатураційний перехід). По зміні спектральних характеристик флуоресценції триптофана, котрі пов'язані зі ступенем завершеності переходу з одного стану в інший, можна робити висновок про конформаційний стан білкових глобул у розчинах [8]. Встановити повноту денатурації, тобто повне зникнення системи нековалентних взаємодій, притаманних нативній структурі білка, доволі важко. Зазвичай обмежуються тим, що спостерігають за зміною котрогось характерного для просторової структури білка параметру при поглибленні умов денатурації. Вважають, що денатурація завершилась, якщо пара-

метр, що спостерігається, досягає декотрого граничного значення [8].

Триптофанова флуоресценція широко застосовується для вивчення структурної поведінки білкової молекули в цілому та як фізичних, так і динамічних властивостей мікрооточення залишків триптофана, також завдяки тому, що параметри флуоресценції залишків триптофана є чутливими і до мікрооточення хромофора в білковій глобулі [7; 10]. Отже зміна інтенсивності світіння і положення максимумів спектру флуоресценції має вказувати на порушення просторової конфігурації, і, відповідно, як на її причину – дію якогось фактора, так і на наслідки – зміну біологічних властивостей білка [8].

Відомо, що триптофаніл на поверхні білкової глобули у високополярному водному мікрооточенні характеризується, як і вільний триптофан у воді, положенням максимуму 350-353 нм і квантовим виходом 0,20-0,25. Всередині білкової глобули в низькополярному мікрооточенні триптофаніл має переважно короткохвильове положення максимуму спектра флуоресценції (329-331 нм) та відносно низький квантовий вихід (0,07-0,10). Положення максимумів спектрів триптофанової флуоресценції більшості білків частіше за все знаходяться в інтервалі від 330 до 345 нм, оскільки, маючи у своєму складі, як правило, понад один триптофановий залишок, ці білки володіють складовими спектрами флуоресценції, які містять понад одну елементарну компоненту. Тобто неможна однозначно інтерпретувати ці спектри з точки зору опису стану окремих флуорофорів або конформерів білка [7; 9].

Відомий спосіб контролю детоксикації токсинів дифтерії на основі визначення інтенсивності флуоресценції у максимумах на довжинах хвиль 360 нм та 450 нм, який запропоновано в ДУ «ІМІ НАМН» для визначення переходу токсину в анатоксин [10]. В зарубіжній науковій літературі знайдено також два джерела стосовно флуориметрії дифтерійного анатоксину, але йдеться про зразки, адсорбовані на гідроксиді алюмінію. В цих роботах досліджувався вплив низької температури та процесу адсорбції дифтерійного анатоксину на гідроксиді алюмінія на особливості спектру флуоресценції [11; 12]. Зроблено висновок про те, що зміни у спектрі флуоресценції дифтерійного анатоксину є ознакою змін третинної структури антигену під впливом холодого шоку в процесі зберігання та транспортування у холододовому ланцюгу, і



вказують на зниження його ефективності [11]. В іншій роботі встановлено, що процес адсорбції дифтерійного анатоксину на ад'юванті гідроксиді алюмінія веде до істотних конформаційних змін у антигені, що може бути встановлено за допомогою різних фізико-хімічних методів [12].

Метою нашого дослідження стало визначення спектрів флуоресцентного світіння зразків нативного очищеного дифтерійного анатоксину (НОДА) різних років виготовлення.

Матеріали і методи дослідження

В нашому розпорядженні було чотири зразки нативного очищеного дифтерійного анатоксину (НОДА), виготовлені на харківському підприємстві ПАТ «Фармстандарт-Біолік» у різні роки: ДА07300(1) – серія 160 від 03.07.2007 р.; ДА07150(2) – серія 160 від 03.07.2007 р., розведена удвічі; ДА10150(3) – серія 50б 1, від 05.11.2010 р.; ДА15270(4) – серія 001018 від 06.02.2015. Були визначені спектри флуоресценції вказаних серій НОДА з використанням

флуориметру Hitachi 850, наданого Інститутом хімії Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна. Спектри флуоресценції побудовані за допомогою програми Microsoft Office Excel 2007. Оскільки всі зразки були виготовлені на одному тому ж самому підприємстві за стандартною технологією і відрізнялися перш за все строком зберігання та вмістом білка, ми спробували розглянути вплив саме цих факторів на особливості спектру флуоресценції досліджуваних препаратів НОДА.

Концентрацію білка у зразках анатоксину визначали за методом Лоурі на кафедрі біохімії Харківського Національного медичного університету.

Одержані результати та обговорення

Графіки залежності інтенсивності флуоресценції зразків нативного дифтерійного анатоксину (по осі ОУ) у діапазоні довжин хвилі від 310 до 500 нм (по осі ОХ) представлені на рисунку 1 (рис. 1).

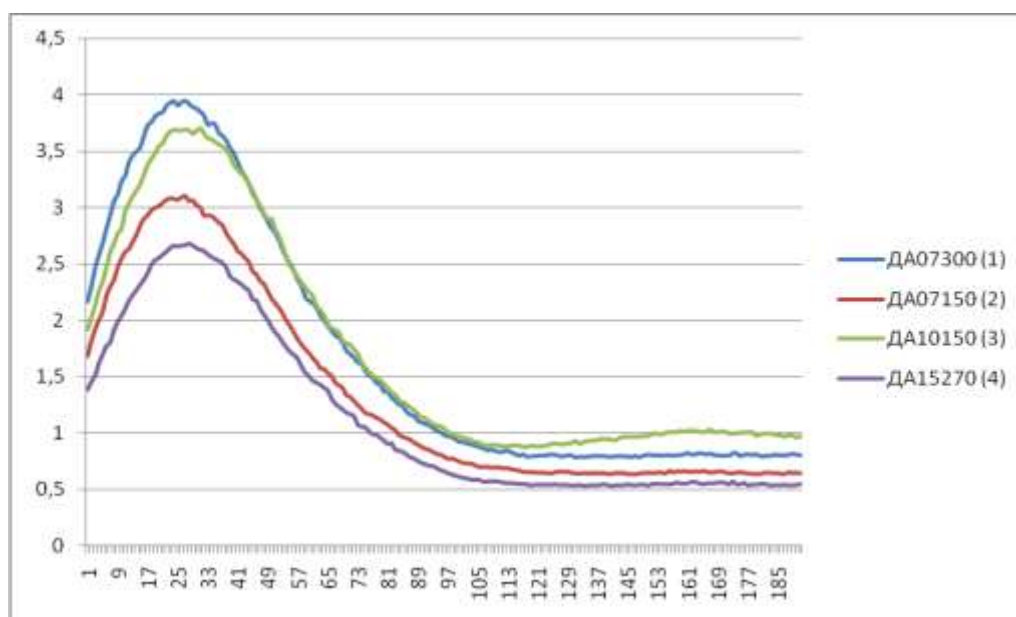


Рисунок 1 – Спектри флуоресценції досліджуваних зразків нативного очищеного дифтерійного анатоксину (в інтервалі від 310 до 500 нм)

Характеристика досліджуваних зразків нативного очищеного дифтерійного анатоксину, а саме: серія, дата виготовлення, строк зберігання препарату, параметри інтенсивності флуоресценції, кількість флокулюючих одиниць дифтерій-

ного анатоксину (Lf/л), вміст білка (г/л) та співвідношення кількості білку до однієї флокулюючої одиниці представлені у таблиці 1 (табл. 1). На підставі аналізу наведених даних можна відзначити ряд закономірностей.

Таблиця 1 – Характеристика досліджуваних зразків очищеного дифтерійного анатоксину

№ пп	Зразок дифтерійного анатоксину (серія, дата виготовлення)	Строк зберігання	Інтенсивність флуоресценції, умовні одиниці	Вміст білка, г/л	Кількість анатоксину, Lf/л	Співвідношення вмісту білка до кількості анатоксину, г/ Lf
1	серія 160 від 03.07.07	9 років	395	0,5762	0,300	1,92
2	серія 160 від 03.07.07, розв.1:2	150	310	0,3002	0,150	2,0
3	серія 50б 1 від 05.11.10	6 років	370	0,4052	0,150	2,70
4	серія 001018 від 06.02.15	1 рік	266	0,9485	0,270	3,51

Первісна антигенна сила зразків НОДА (або кількість анатоксину в одиниці об'єму), яка вимірюється у флокулюючих одиницях і визначається ініціальною флокуляцією – випадінням у осад білкового комплексу в результаті взаємодії *in vitro* анатоксину з антитоксичною сироваткою, – була максимальною у зразку № 1 від 2007 року (0,300 Lf/л), у зразку № 3 від 2010 року вона була вдвічі меншою (0,150 Lf/л), а у зразку № 4 від 2015 року – кількість анатоксину складала 0,270 Lf/л. Розглядаючи співвідношення кількості білку до однієї флокулюючої одиниці, становиться очевидним, що цей показник зменшується з подовженням строку виготовлення препаратів: зразок № 4 – 3,5 г/ Lf, зразок № 3 – 2,7 г/ Lf, зразок № 1 – 1,92 г/ Lf. Тобто можна припустити, що специфічність білку в анатоксині у старіших зразках, де на одну флокулюючу одиницю приходиться менше білка, була вищою.

При розведенні удвічі зразка № 1 інтенсивність флуоресцентного світіння зменшилася на 22 відсотки (зразок № 2), але взагалі не встановлено очевидного впливу вміста білка в препараті на інтенсивність його флуоресценції, оскільки максимальна концентрація білка була у зразку № 4 з мінімальною інтенсивністю світіння, а зразок № 1, який показав максимальну інтенсивність флуоресценції, мав середню концентрацію білка відносно до двох інших зразків. Максимуми флуоресценції в усіх досліджених нами зразках знаходилися у діапазоні поміж 330 і 345 нм, характерному для флуоресценції білків: 336 нм (зразки № 1, 2), 340 нм (зразок № 3), 338 нм (зразок № 4).

Інтенсивність флуоресценції виявилася максимальною у найдавнішому зразку № 1 від 2007 року – 395 умовних одиниць, і, навпаки, мінімальною – у зразку № 4, виробленому у 2015 році, – 266 умовних одиниць, тобто чим більший строк зберігання НОДА, тим більші максимуми флуоресценції. Пояснити такий результат можна, виходячи з конформаційних змін у молекулярній структурі зразків. В процесі тривалого зберігання у білкових молекулах дифтерійного анатоксину відбуваються денатураційні процеси, які проявляються у розпушенні білкових глобул, вивільненні залишків триптофана, що підвищує інтенсивність флуоресцентного світіння. Слід зазначити, що у згаданому вище способі контролю детоксикації токсинів дифтерії вимірювалася флуоресценція неочищених зразків анатоксину в процесі та відразу після детоксифікації [10]. Інтенсивність флуоресценції свіжевиготовленого дифтерійного анатоксину була на порядок нижчою за одержані нами показники інтенсивності світіння НОДА: від 12 до 26 умовних одиниць, тоді як нативний дифтерійний токсин характеризувався ще нижчим рівнем світіння: від 2 до 9 умовних одиниць. Цей факт підтримує нашу гіпотезу про те, що з часом, завдяки розвитку денатураційних процесів, світіння НОДА стає більш інтенсивним, та, відповідно, знижується його специфічна активність. Очевидно, що ступінь денатурації визначає рівень специфічної (імуногенної) активності зразку дифтерійного анатоксину. Отже якщо активність зберігається, то ймовірно йдеться про першу стадію денатурації – функціональний перехід в межах нативної структури білка. При повному розгортанні амінокислотного білко-



го ланцюжку активність дифтерійного анатоксину вочевидь втрачається, на що може вказувати відносно підвищення рівню світіння, визначеного для зразків НОДА з різним ступенем специфічної активності.

Висновки

1. Оскільки флуориметрія може бути використана для моніторингу конформаційних змін зразків дифтерійного анатоксину, цей фізико-хімічний метод може запропонувати зразки для регуляції контролю якості вакцини шляхом впровадження у виробництво демонстрації динаміки спектрів флуоресценції.

2. Здійснення скринінгу спектру флуоресценції напрацьованих виробничих зразків анатоксину в процесі їх зберігання може допомогти виявленню серій, в котрих відбулася реверсія анатоксину в токсин або котрі з тих чи інших причин в певній мірі втратили свою специфічну активність. Застосування цього методу дослі-

Очевидно, що у випадку, коли відбулася реверсія анатоксину в токсин, інтенсивність флуоресценції НОДА повинна істотно зменшитися.

дження потенційно зменшує кількість лабораторних тварин для тестування зразків вакцини, оскільки дає можливість за даними флуориметрії оперативно виявити зразки, якість яких викликає сумніви.

Для встановлення кількісних закономірностей поміж інтенсивністю флуоресцентного світіння та специфічною активністю препаратів в подальших дослідженнях потрібно було б провести скринінг статистично значущої кількості серій дифтерійного анатоксину з паралельним визначенням їх антигенної сили у реакції флокуляції, антигенності і РПГА та ІФА та імуногенності на лабораторних тваринах.

Подяка

Автори щиро вдячні співробітникам відділу фізико-органічної хімії Науково-дослідного інституту хімії Харківського національного університету ім. В. Н. Каразіна за допомогу при

здійсненні вимірювань флуоресценції досліджуваних зразків та ПАТ «Фармстандарт-Біолік» за надані зразки нативного очищеного дифтерійного анатоксину.

References (список літератури)

1. Middlebrook JL, Dorland RB. [Bacterial toxins: Cellular Mechanisms of Action] *Microbiological Reviews*. 1984; Sept.:199–221.
2. Zhukova YaF, Dzhedzhula GG, Radavskij YuL. *Strukturno-funkcional'na organizaciya difterijnogo toksinu* [Structural and functional organization of diphtheria toxin] *Mikrobiol. zhurn.* 1997;59(3):91–101.
3. Collier RJ. [Diphtheria toxin: Mode of action and structure] *Bacteriol. Rev.* 1975;39:54–85.
4. Dawson R, Elliot D, Elliot W, Jones K. *Spravochnik biohimika* [Biochemist Handbook], Moscow: Mir Publ., 1991. 556 p.
5. Stainer DW, Cameron J. [Irreversibility of toxoids. An improved method of testing] *Dev Biol Stand.* 1977;34:149–153.
6. Akama K, Ito A, Yamamoto A, Sadahiro S. [Reversion of toxicity of tetanus toxoid] *Jpn J Med Sci Biol.* 1971 Jun;24(3):181–183.
7. Kudryashova EV, Gladilin AK, Levashov AV. *Belki v nadmolekulyarnyh ansamblyah: issledovanie struktury metodom razreshenno-vremennoj fluorescentnoj anizotropii.* [Proteins in supramolecular ensembles: a study of the structure of the method of allowed-time fluorescence anisotropy] *Uspekhi biologicheskoy himii.* 2002;42:257–294.
8. Vlasova I M, Zhuravleva VV, Saleckij AM. *Inducirobannaya dodecilsul'fatom natriya denaturaciya bych'ego syvorotochnogo al'bmina po dannym triptofanovoj fluorescencii belka* [Induced SDS denaturation of bovine serum albumin according tryptophan fluorescence protein] *Himicheskaya fizika.* 2014; 33(5):69–75.
9. Burstein EA, Abornev SM, Reshetnyak YK. [Decomposition of protein tryptophan fluorescence spectra into log-normal components. I. Decomposition algorithms] *Biophys J.* 2001;81(3):1699–1709.
10. Babich ЄМ, Posohov ЄО, Kalinichenko SV, Rizhkova TA, Sklyar NI, Antusheva TI, Bilozers'kij VI, Eglit VO *Sposib kontrolyu detoksikacii toksiniv difterii* [Control method of detoxification of diphtheria toxin] Ukrainian patent, no 80581, 2013.



11. Braun LJ, Tyagi A, Perkins S, Carpenter J, Sylvester D, Guy M, Kristensen D, Chen D.[Development of a freeze-stable formulation for vaccines containing aluminum salt adjuvants] *Vaccine*. 2009; Jan.;1;27(1):72-9.
12. Régnier M1, Metz B, Tilstra W, Hendriksen C, Jiskoot W, Norde W, Kersten G.[Structural perturbation of diphtheria tox-

oid upon adsorption to aluminium hydroxide adjuvant] *Vaccine*. 2012 Nov 6;30(48):6783-8.

(received 09.02.2017, published online 29.03.2017)

(одержано 09.02.2017, опубліковано 29.03.2017)

