

АЛЕРГІЧНА ДІЯ ПРЕПАРАТУ «ZG-2011», ЩО СКЛАДАЄТЬСЯ З ЕКЗОТОКСИНІВ

Г. А. ЗАВІРЮХА, кандидат сільськогосподарських наук, завідувач відділу мікробіології,

<https://orcid.org/0000-0002-46028477>

ДНУ «Державний центр інноваційних біотехнологій», м. Київ
У. М. ЯНЕНКО, кандидат ветеринарних наук, завідувач відділу молекулярно-біологічних досліджень, вірусології та імунології,
<https://orcid.org/0000-0001-5678-3356>

ДНУ «Державний центр інноваційних біотехнологій», м. Київ
Н. І. КОС'ЯНЧУК, кандидат ветеринарних наук, доцент кафедри гігієни тварин та санітарії ім. проф. А. К. Скороходька,
<https://orcid.org/0000-0002-3055-8107>

Національний університет біоресурсів і природокористування України
E-mail: annazavir@gmail.com, ulyanakuzyk@ukr.net, ninaiva2@ukr.net

Анотація. Згідно нормативної бази України та стандартів Євросоюзу і США, гель-електрофорез включено до процедури контролю якості протеїнових препаратів фармакологічного застосування. У редакції наказу МОЗ України від 04.01.2013 р. № 3, зареєстрованого у Міністерстві юстиції України 15 березня 2013 р. за № 425/22957 приписано проведення біологічної активності препаратів як на етапі розробки активної речовини або лікарського препарату. Метою нашої роботи було проведення дослідження екзотоксинів патогенних мікроорганізмів щодо вмісту сумарного білка електрофоретичним методом і на моделі дослідного препарату «ZG-2011» та його алергенну дію. Визначення кількісного вмісту білка проводили спектрофотометрично з використанням набору Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo scientific). Дослідження алергенної дії препарату «ZG-2011» проводили в реакції гіперчутливості уповільненого типу на мишах. Застосовані методи дослідження: метод підрахунку колоній утворюючих організмів, визначення титру концентрації методом диск-преципітації та дослідження протеїнів за допомогою електрофорезу. За результатами досліджень встановлено кількісний вміст білка у екзотоксинів штамів *Bacillus anthracis*. Визначено, що екзотоксин штаму *Bacillus anthracis* K-79Z у титрі специфічних сибіркових білків 1:128 має найнижчу кількість загального білка, тоді як у екзотоксинів вакцинних штамів *B. anthracis* 55, *B. anthracis* СБ за різних титрів цей показник стабільно високий. Дослідження алергенної дії препарату, створеного на основі екзотоксинів, показало, що введення препарату призводить до збільшення індексу реакції гіперчутливості уповільненого типу в мишей обох статей. Встановлено, що препарат здатен викликати реакцію загальної анафілаксії слабкої та

помірної інтенсивності за наявності індивідуальної чутливості організму до його складових. В перспективі будуть проведені дослідження щодо впливу екзотоксинів на лабораторних тварин та препаратів на їх основі.

Ключові слова: алергенна дія, екзотоксин, електрофорез, сибірка

Актуальність

Погодження і підписання угоди про асоціацію між Україною і ЄС від 21 березня 2014 р. та 27 червня 2014 р. активізувало питання щодо можливості поступової інтеграції наукового і виробничого комплексу України у європейський простір та погодження національної політики в області біотехнологій. Створення нових вакцинних препаратів, удосконалення заходів імунопрофілактики, новітні методики розробки з метою підвищення ефективності є важливим питанням сучасної біотехнології.

Аналіз останніх досліджень та публікацій

Для успішної реалізації біотехнологічних процесів важливими параметрами біооб'єктів є відповідність щодо вимог біотехнологічного виробництва та якості біологічного матеріалу. Швидкість розмноження клітин прямо пропорційно відбивається на збільшенні біомаси і утворення токсинів. Активність і стабільність перебування біооб'єктів в активному стані (здатність продукувати екзотоксин, можливість багаторазового пасажування, збереження показників якості протягом терміну придатності тощо) — найважливіші показники придатності для тривалого використання в біотехнології та конструюванні нових препаратів (Herasymenko et al., 2006). Застосування неякісних

препаратів може стати джерелом поширення ряду емерджентних інфекцій, чинники яких можуть бути джерелом контамінації біотехнологічної продукції та сировини для їх виготовлення.

Особливістю біології збудника сибірки (польових та вакцинних) є продукція екстрацелюлярного токсину. Цей продукт метаболізму вегетативної форми бацил складається з трьох фракцій: проективна (захисна), набрякова та летальна (Varshney & AK, 2016; Brossier & Mock, 2001).

Застосування екзотоксинів бактерій є новим підходом терапії та профілактики багатьох хвороб вірусної та бактеріальної етіології. Експериментальні препарати, що містять екзотоксини, показують в досліджах *in vivo* швидкий ріст макрофагів, а *in vitro* — високу первентивну активність та формування імунітету в лабораторних тварин (Friebe et al., 2016; Kintzer et al., 2009).

Екзотоксини збудника сибірки як біотехнологічні об'єкти зосереджують увагу багатьох вчених різних країн. Науковці досліджували структури токсину (Friebe et al., 2016), його проникнення в клітини та імунологічні ефекти. Дослідження захисного фактору антигену та механізм утворення показали, що він може служити новим засобом контролю цитотоксичності (Kintzer et al., 2009). Вчені (Lacy et al., 2002, Slater et al., 2013) проводили вивчення комплексної дії екзотоксинів в якості

токсичних комплексів та дослідження механізму дії на клітину захисного екзотоксину на фоні дії летального та набрякового токсину.

Наукові праці з вивчення токсину *B. anthracis* (ANTXR1), відомого ще як пухлинний ендотеліальний маркер, показали, що він є висококонсервативним білком поверхні клітини, який експресується згори на судинну систему, що інфільтрує пухлину. Цим він приводить до порушення росту пухлин людини різної етіології, включаючи меланому, рак молочної залози, товстого кишковика й легень (Chaudhary et al., 2012).

Науковці державної наукової установи «Державний центр інноваційних біотехнологій» (ДНУ «ДЦІБ») розробили препарат «ZG-2011», до складу якого входить екзотоксин *Bacillus anthracis*. Згідно з Наказом МОЗ України від 26.08.2005 р. № 426 «Про затвердження порядку проведення експертизи реєстраційних матеріалів на лікарські засоби, що подаються на державну реєстрацію (перереєстрацію), а також експертизи матеріалів про внесення змін до реєстраційних матеріалів протягом дії реєстраційного посвідчення» у редакції наказу МОЗ України від 04.01.2013 р. № 3, зареєстрованого у Міністерстві юстиції України 15 березня 2013 р. за № 425/22957 приписано проведення біологічної активності препаратів як на етапі розробки активної речовини або лікарського препарату, так і за їх реєстрації (перереєстрації) (Наказ від 26.08.2005 № 426). Для таких продуктів, активними речовинами яких зазвичай є протеїни та/або поліпептиди, необхідно застосовувати прийнятні фізико-хімічні, біохімічні та імунохімічні методи аналізу, що дають можливість детально охарак-

теризувати активні речовини та/або лікарські препарати.

Згідно з нормативною базою України та стандартами Євросоюзу і США, гель-електрофорез включено до процедури контролю якості протеїнових препаратів фармакологічного застосування. До переліку обов'язкових досліджень з характеристики препаратів входить вивчення алергенної дії на живий організм (біопроба).

Мета роботи – проведення дослідження екзотоксинів вакцинних штамів *B. anthracis* на вміст сумарного білка електрофоретичним методом та дослідження алергенної дії експериментального препарату, до складу якого входять екзотоксини.

Дослідження були проведені за програмою № 01110006386 «Проведення наукових досліджень з метою розробки методів ранньої діагностики, профілактики та лікування інфекційних хвороб, спільних для людей і тварин».

Матеріали та методи дослідження

Матеріалом для досліджень були вакцинні штами – *B. anthracis* K-79Z, *B. anthracis* 55, *B. anthracis* СБ, з колекції музейних культур ДНУ «ДЦІБ». У дослідах використовували екзотоксини *B. anthracis* K-79Z з титром за реакцією диск преципітації (РДП) – 1 : 32; 1 : 64; 1 : 128. Для порівняння сибіркових протеїнів використовували екзотоксини від *B. anthracis* 55 ВНИИВиМ (титри в РДП – 1 : 16) та *B. anthracis* СБ (титри в РДП – 1 : 32).

Визначення кількісного вмісту білка проводили спектрофотометрично по Леммелізу використанням набору Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo scientific).

Дослідження алергенної дії препарату «ZG-2011» проводили в реакції

гіперчутливості уповільненого типу на мишах ($n = 10$, $m = 20,0 \pm 0,5$ г). Для відтворення реакції гіперчутливості уповільненого типу тваринам дослідної групи одноразово внутрішньошкірно в основу хвоста вводили 60 мкм емульсії препарату «ZG-2011» в розчині Хенкса з додаванням повного ад'юванта Фрейнда (ПАФ) у співвідношенні 1:1. Тварин контрольної групи сенсibiliзували 60 мкл емульсії ПАФ в розчині Хенкса. Внутрішньошкірний шлях введення вибраний як такий, що максимально стимулює імункомпетентні органи організму (Habriev, 2005, Fisenko, V. P. 2000).

Для вивчення сенсibiliзації через 5 діб мишам дослідної групи в апоневроз правої задньої лапи тварин (дослідної) вводили 40 мкл розчину препарату в розчині Хенкса. Контрольна група тварин одержувала 40 мкл розчину Хенкса. У апоневроз лівої задньої лапи тваринам вводили такий же об'єм фізіологічного розчину. Вимірювання товщини задніх лап здійснювали через 6 та 24 години після введення вирішальної дози за допомогою мікрометра МК-25.

Інтенсивність реакції (ІР) обчислювали для кожної тварини окремо за формулою:

$$\text{ІР} = \frac{\text{Д-К}}{\text{К}} \times 100\%,$$

де Д – товщина задньої правої лапи (дослідної), мм;

К – товщина задньої лівої лапи (контрольної), мм.

Для відтворення реакції загальної анафілаксії проводили сенсibiliзацію мурчаків ($n = 10$, $m = 250,0 \pm 0,5$ г) експериментальної групи протягом 5 днів. В перший день вводили тест-зразок підшкірно у дозі 0,5 мл / кг маси тіла, починаючи з другого по п'ятий

день – по 0,5 мл / кг внутрішньом'язово. Контрольній групі тварин вводили фізіологічний розчин за тією ж схемою. Через 14 днів після останньої ін'єкції тваринам експериментальної та контрольної груп вводили внутрішньосерцево вирішальну дозу препарату. Оцінка реакції загальної анафілаксії проводилася в індексах за Weigle (Habriev, 2005, Fisenko, 2000).

Статистична обробка даних проводилася з використанням MS Excel. Дані наведені як середнє значення $\pm$ похибка середнього значення ($M \pm m$). Аналіз вірогідності результатів експерименту проводився з використанням t -критерію Ст'юдента. Різницю між досліджуваними показниками вважали статистично вірогідною за значення $P < 0,05$.

Результати дослідження та їх обговорення. Дослідження розпочинали з отримання чистих від контамінації культур штамів *B. anthracis* K-79Z, *B. anthracis* 55, *B. anthracis* СБ. Різні культури штамів були використані для порівняння з метою виявлення екзотоксину з найвищим титром сибіркового білка і найменшою сумарною кількістю.

До експерименту залучалися культури, у яких кількість мікробних клітин в 1 см³ культуральної рідини становила: *B. anthracis* K-79Z – $30,5 \times 10^6$ колоній утворюючих організмів (КУО), для *B. anthracis* 55 ВНИИВуМ – 114×10^6 КУО, для *B. anthracis* СБ – $20,4 \times 10^6$ КУО. Така кількість мікроорганізмів була використана для отримання екзотоксинів з різними титрами. Екзотоксини вищезазначених штамів отримували за авторським свідоцтвом № 1022362, СССР (Zaviruha, 1987).

Визначення кількісного вмісту білка проводили спектрофотометрично з використанням набору Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo scientific).

Для приготування зразків для електрофорезу до екстрактів білків додавали буфер Леммлі у співвідношенні: екстракт – буфер – 1: 4. Відбирали по 90,0 мкл досліджуваних зразків та додавали 30,0 мкл 4X буфера Лемлі. Зразки прогрівали впродовж 5 хв на водяній бані за температури 100 °С.

Для постановки електрофорезу використовували електрофорез білків в поліакриламідному гелі в присутності додецилсульфату натрію по Леммлі (англ. SDS PAGE). У результаті проведених вимірювань встановлено вміст сумарного білка в дослідних зразках (табл. 1).

Як видно з таблиці 1, концентрація сумарного білка в екотоксинах вакцинних штамів неоднакова. Під час дослідження екзотоксину *B. anthracis* СБ нижча концентрація сумарного білка встановлена за титру 1:32. Екзотоксин штаму *B. anthracis* 55 з титром 1:16 також показав високу концентрацію сумарного білка. Дослідження екзотоксину *B. anthracis* K-79Z зменшується за зростання титру специфічного сибіркового антигена. Найнижчий вміст сумарного білка встановлено в екзотоксині штаму *B. anthracis* K-79Z з титром 1:128, що вказує на ефективність використання вакцинного штаму для отримання екзотоксину з найвищим титром.

Дослідження алергенної дії препарату «ZG-2011» проводили за реакцією гіперчутливості уповільненого типу на мишах. Дані вимірювання величини набряку та розрахунок індексів інтенсивності реакції гіперчутливості уповільненого типу через 6 та 24 години після введення препарату приведені в таблиці 2.

За даними таблиці 2 видно, що через 6 год після введення препарату індекс реакції гіперчутливості уповільненого типу складав для самок $55,8 \pm 3,52$. У тварин контрольної групи індекс реакції дорівнював $1,30 \pm 0,20$. Через 24 години набряк в місці введення препарату (експериментальної) зменшився до $34,33 \pm 2,76$. У тварин контрольної групи індекс реакції практично не змінився ($1,16 \pm 0,16$).

Встановлено, що серед самців через 6 год після введення дози препарату індекс реакції гіперчутливості уповільненого типу складав $52,6 \pm 2,82$. У тварин контрольної групи ця величина дорівнювала $1,56 \pm 0,23$. Через 24 год після введення останньої дози набряк на місці введення у тварин зменшився до $41,1 \pm 2,14$. Величина набряку у самців через 24 год після введення дози препарату була вищою у порівнянні з набряком у самок. У тварин контрольної групи індекс реакції практично не змінився і становив $1,30 \pm 0,26$.

1. Результати визначення кількості сумарного білка

№	Назва	Титр за РДП	Концентрація в мг/мл
1	<i>B. anthracis</i> K-79Z	1:32	0,39
2	<i>B. anthracis</i> K-79Z	1:64	0,2
3	<i>B. anthracis</i> K-79Z	1:128	0,19
4	<i>B. anthracis</i> СБ	1:16	0,4
5	<i>B. anthracis</i> СБ	1:32	0,56
6	<i>B. anthracis</i> 55	1:16	0,5
7	Живильний бульйон	-	0,57

2. Вплив препарату «ZG-2011» на індекс реакції гіперчутливості у білих мишей ($M \pm m$, $n = 10$, $m = 20,0 \pm 0,5$ г)

Експериментальні групи	Термін реєстрації реакції, год			
	6	24	6	24
	Самці		Самки	
Контроль	1,56 $\pm$ 0,23	1,16 $\pm$ 0,16	1,30 $\pm$ 0,20	1,30 $\pm$ 0,26
Дослід («ZG-2011»)	52,6 $\pm$ 2,82	41,1 $\pm$ 2,14	55,8 $\pm$ 3,52	34,33 $\pm$ 2,76

3. Оцінка реакції загальної анафілаксії у мурчаків за дії препарату «ZG-2011» ($n = 10$, $m = 250,0 \pm 0,5$ г)

Групи	Номер тварин/індекс загальної анафілаксії									
Дослідна	1/0	2/0	3/++	4/+	5/+	6/++	7/0	8/++	9/0+	10/0
Контрольна (фізрозчин)	11/0	12/0	13/0	14/0	15/0	16/0	17/0	18/0	19/0	20/0

Дослідження реакції загальної анафілаксії у мурчаків проводили в індексах Weigle (Habrieu, 2005). Дані спостереження реакції загальної анафілаксії зареєстровані протягом першої години після введення препарату представлені в таблиці 3.

За результатами дослідження у п'яти з десяти мурчаків дослідної групи препарат викликав реакцію загальної анафілаксії. У 3 тварин з 10 (дослідна група) спостерігався шок помірної інтенсивності, у 2 – реєструвалися ознаки анафілактичного шоку. Всі тварини були живі.

реного на основі екзотоксинів, за тестом реакції гіперчутливості уповільненого типу набілих мишей показав, що введення препарату призводить до збільшення індексу реакції гіперчутливості уповільненого типу у мишей обох статей. Встановлено, що препарат може викликати реакцію загальної анафілаксії слабкої та помірної інтенсивності за наявності індивідуальної чутливості організму до його складових.

У перспективі будуть проведені дослідження щодо впливу екзотоксинів та препаратів на основі екзотоксинів на лабораторних тварин.

Висновки і перспективи

За результатами досліджень встановлено кількісний вміст білка екзотоксинів *B. anthracis*. Визначено, що екзотоксин штаму *B. anthracis* K-79Z у титрі специфічних сибіркових білків 1:128 має найнижчу кількість загального білка, тоді як екзотоксини вакцинних штамів *B. anthracis* 55, *B. anthracis* СБ стабільно високий (0,5 мг / мл *B. anthracis* СБ проти 0,19 мг / мл *B. anthracis* K-79Z). Дослідження алергічності препарату, ство-

References

- Brossier, F., Mock, M. (2001). Toxins of *Bacillus anthracis*. *Toxicon*, 39 (11):1747–1755. [https://doi.org/10.1016/S0041-0101\(01\)00161-1](https://doi.org/10.1016/S0041-0101(01)00161-1).
- Chaudhary, A., Hilton, M. B., Seaman, S., Haines, D. C., Stevenson, S., Lemotte, P. K., William, R., Tschantz, W. R., Zhang, X. M., Saha, S., Fleming, T., Croix, B. St. (2012). TEM8/ANTXR1 Blockade Inhibits Pathological Angiogenesis and Potentiates Tumorcidal Responses against Multiple Cancer Types. *Cancer Cell*, 21(2): 212–216. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2012.01.004>.

- Fabre, L., Santelli, E., Mountassif, D., Donoghue, A., Biswas, A., Ikard Blunck, R., Hanein, D., Volkmann, N., Liddington, R., Rouiller, I. (2016). Structure of anthrax lethal toxin prepore complex suggests a pathway for efficient cell entry. *Journal of General Physiology*, 148(4):313–324. <https://doi.org/10.1085/jgp.201611617>.
- Fisenko, V. P. (2000). *Rukovodstvo po jeksperimental'nomu (doklinicheskomu) izucheniju novyh farmakologicheskikh veshhestv*. Manual on experimental (preclinical) study of new pharmacological substances. – Moscow: Remedium, 398. (in Russian)
- Friebe, S. F., Gisou van der Goot, Bürgi Friebe, J. (2016). The Ins and Outs of Anthrax Toxin. *Toxins*, 8(3): 69. <https://doi.org/10.3390/toxins8030069>.
- Habrieu, R. U. (2005). *Rukovodstvo po jeksperimental'nomu (doklinicheskomu) izucheniju novyh farmakologicheskikh veshhestv*. Manual on experimental (preclinical) study of new pharmacological substances. – Moscow: Medicina, 832. (in Russian)
- Herasymenko, V. H., Herasymenko, M. O., Tsvilikhov's'kyi, M. I., Kotsyumba, I. Ya., Zakharenko, M. O., Obrazhey, A. F., Holovko, A. M. (2006). *Biotechnologiya* [Biotechnology]. Kyiv: INKOS, 15–20. (in Ukrainian)
- Kintzer, A. F., Thoren, K. L., Sterling, H. J., Dong, K. C., Feld, G. K., Tang, I. I., Zhang, T. T., Williams, E. R., Berger, J. M., Krantz, B. A. (2009). The protective antigen component of anthrax toxin forms functional octameric complexes, 3: 614–629. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2009.07.037.2>
- Lacy, D. B., Mourez, M., Fouassier, A., Collier, R. J. (2002). Mapping the anthrax protective antigen bindings Site on the lethal and edema factors. *Journal of biological chemistry*, 277(4):3006–3010. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109997200>.
- Slater, L. H., Hett, E. C., Clatworthy, A. E., Mark, K. G., Hung, D. T. (2013). *PNAS*, 10 (24): 9932–9937. <https://doi.org/10.1073/pnas.1302257110>.
- Fisenko, V. P. (2000). *Rukovodstvo po eksperimental'nomu (doklinicheskomu) izucheniju novyh farmakologicheskikh veshhestv*. – Moscow: Remedium, 398. (in Russian)
- Varshney, A. G. (2016). Development of Recombinant Domains of Protective Antigen of *Bacillus anthracis* and Evaluation of their Immune Response in Mouse Model for Use as Vaccine Candidates for Anthrax. *Journal of Bioterrorism & Biodefense*, 7:2–8. <https://doi.org/10.4172/2157-2526.1000147>.

Yanenko, Y. M., Zaviriuha, G. A., Kos'yanchuk, N. Y. (2019). ALLERGIC EFFECT OF THE PREGRATE «ZG-2011», CONSISTING OF EXOTOXINS. *Ukrainian Journal of Veterinary Sciences*, 10(4): 86–93, <https://doi.org/10.31548/ujvs2019.04.011>

Abstract. Gel-electrophoresis is included in the quality control procedures of protein preparations of pharmacological use in accordance with the regulatory framework of Ukraine and the standards of the European Union and the USA. Determination of the biological activity of the drug is prescribed at the stage of development of the active substance and the drug as amended by the order of the Ministry of Health of Ukraine dated January 4, 2013 No. 3, registered with the Ministry of Justice of Ukraine on March 15, 2013 No. 425/22957. Goal: to study the exotoxins of pathogenic microorganisms on the content of total protein by the electrophoretic method, which are part of the experimental drug “ZG-2011”, a study of the allergenic effect of the drug. The amount of protein was determined spectrophotometrically using the Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo scientific). The study of the allergenic effect of the drug “ZG-2011” was carried out in a delayed-type hypersensitivity reaction in mice. Research methods: method of counting colo-

nies of organisms, determination of the concentration titer in the reaction of disk precipitation, protein studies using electrophoresis. Results: the quantitative protein content in exotoxins of strains of Bacillus anthracis was established according to the study. The exotoxin of the strain Bacillus anthracis K-79Z, in the titer of specific anthrax proteins 1: 128, has a low amount of total protein. While the exotoxins of the vaccine strains of B. anthracis 55, B. anthracis SB at various titers has a stable high rate. A study of the allergenic effect of the drug that contains exotoxins shows that the administration of the drug leads to an increase in the delayed-type hypersensitivity reaction index in mice of both sexes. It was found that the drug is able to cause a general anaphylaxis reaction of weak and moderate intensity in the presence of an individual sensitivity of the body to its components. A study of the influence of exotoxins on laboratory animals and preparations based on exotoxins is expected in the future.

Keywords: *allergenic effect, exotoxin, electrophoresis, anthrax*

Подано до друку 6 вересня 2019 року