

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Автандилов Г.Г. Медицинская морфометрия. М.: Медицина; 1990. 384 с.
2. Александрова Г.П., Медведева С.А., Грищенко Л.А., Дубровина В.И., изобретатели. Металлопроизводные арабиногалактана, способ получения металлопроизводных арабиногалактана. Патент РФ № 2194715 РФ, МПК А61 К 47/48. № 2000 121112; Заявл. 04.08.00; Опубл. 20.12.02, Бюл. № 35.
3. Бугоркова С.А., Белобородов Р.А., Дальвадяц С.М. Морфологическая характеристика иммунокомпетентных органов морских свинок при ревакцинации живой и химической чумными вакцинами. Пробл. особо опасных инф. 2007; 1(93):69–73.
4. Домадский И.В. Чума. М.: Наука; 1998. 148 с.
5. Дубровина В.И. Механизмы фагоцитоза и его роль при формировании резистентности к чуме, псевдотуберкулезу и туляремии [автореф. дис. д-ра биол. наук]. Иркутск; 2004. 42 с.
6. Кузнецов С.Л., Мушкамбаров Н.Н., Горячкина В.Л. Атлас по гистологии, цитологии и эмбриологии. М.: МИА; 2002. 373 с.
7. Лилли Р. Патогистологическая техника и практическая гистохимия. М.: Мир; 1969. 645 с.
8. Труфакин В.А., Шурлыгина А.В., Робинсон М.В. Морфология. 2005; 4:20–4.

S.A.Vityazeva, T.P.Starovoitova, V.I.Dubrovina, S.A.Medvedeva,
L.A.Grischenko, T.T.Shkaruba

Morphological Alterations in Immunocompetent Organs of Animals in Dynamics of Vaccinal Process Caused by Live Plague Vaccine with Immunomodulators

Anti-Plague Research Institute of Siberia and Far East, Irkutsk; Institute of Chemistry of Siberian Branch of Russian Academy of Science, Irkutsk

Arabinogalactane isolated from Siberian larch (*Larix sibirica*) and its iron and cobalt nanobiocomposites were selected as immunomodulators to elucidate the possibility of intensification of specific immunity against plague.

Comparative morphometric analysis of immune system organs of white mice inoculated with live plague vaccine (LPV) and its combination with immunomodulators was performed. Experimental data indicate that arabinogalactane and its nanobiocomposites used in combination with LPV increase immunocytopoietic function of immune system organs to larger extent than LPV.

Key words: live plague vaccine, immunity, immunomodulators, immunocompetent organs.

Поступила 27.05.08.

УДК 616.988.21:576.8.097.3

С.В.Генералов, Е.Г.Абрамова, А.К.Никифоров, Е.М.Храмкова, И.А.Шепелёв, Л.В.Савицкая, Л.Н.Минаева, М.В.Галкина, Т.А.Михеева, Н.Н.Кочкалова, М.Н.Киреев

ПОЛУЧЕНИЕ ПРЕПАРАТА F(ab')₂-ФРАГМЕНТОВ АНТИРАБИЧЕСКОГО ИММУНОГЛОБУЛИНА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ИММОБИЛИЗОВАННОГО ПЕПСИНА

ФГУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Саратов

Разработана биотехнологическая схема получения F(ab')₂-фрагментов антирабического иммуноглобулина с помощью иммобилизованного пепсина. Определены оптимальные способы получения иммобилизованного пепсина, подобраны условия ферментативного гидролиза антирабического иммуноглобулина. Проведена оценка протективных свойств препарата F(ab')₂-фрагментов антирабического иммуноглобулина, полученного настоящим способом.

Ключевые слова: бешенство, антирабический иммуноглобулин, F(ab')₂-фрагменты, иммобилизованный пепсин.

Среди мер, применяемых для профилактики и лечения ряда инфекционных болезней, большое значение придается иммуноглобулиновым препаратам. Для постэкспозиционной профилактики гидрофобии в медицинской практике широко используется гетерологичный антирабический иммуноглобулин. Согласно данным ВОЗ, в настоящее время препараты гетерологичного антирабического иммуноглобулина являются высокоочищенными и безопасными, однако у 1–2 % пациентов при его введении могут возникнуть побочные реакции [13].

Одним из направлений совершенствования антирабического иммуноглобулина представляется разработка способов дополнительной очистки с помощью ферментативного гидролиза иммуноглобулина с последующим хроматографическим фракционированием [8, 9]. В литературе описано применение различных ферментов для протеолиза иммуноглобулина. Таковыми являются пепсин, папаин, плазмин, химопапаин, фицин, бромелаин, ферменты микроорганизмов – *S. aureus* V8, грибов рода *Aspergillus* [1].

При воздействии пепсина на молекулу иммуноглобулина образуются один F(ab')₂-фрагмент и один Fc'-фрагмент. Способность связывать антиген сохраняется в F(ab')₂-фрагментах, а связывание компонента и связывание ткани сохраняется во фрагменте Fc. Таким образом, удаление Fc-части иммуноглобулина, приводит к ликвидации нежелательных взаимодействий с Fc-рецепторами тканей и уменьшает частоту побочных реакций.

Для ферментативной обработки иммуноглобулина весьма приемлемо использование иммобилизованных протеаз. Работа с иммобилизованными ферментами обеспечивает возможность их многократного применения и быстрого извлечения из реакционной среды, а также позволяет исключить стадию удаления остаточного фермента.

Материалы и методы

В работе использовали коммерческий препарат иммуноглобулина антирабического лошадиного производства РосНИПЧИ «Микроб». Для проведе-

ния реакций гидролиза применяли кристаллический пепсин (Merck). Имобилизацию пепсина осуществляли методами адсорбции на DEAE-целлюлозе (Merck) [6], сополимеризации фермента [11], осаждения гидроксидом титана (Merck) [5], ковалентным присоединением фермента к следующим носителям: природному силикату [10], полистирольному носителю Dowex AG 1X8 [11], аминокселиагарозе (Sigma) [12]. Для активации носителей использовали следующие реактивы: аминопропилтриэтоксисилан (Sigma), глутаровый альдегид (Merck), N-циклогексил-N'-(2-морфолиноэтил)-карбодиимид мето-р-толуолсульфонат (Sigma).

Определение протеолитической активности ферментов осуществляли по методу Н.П.Пятницкого [2]. Для определения стабильности иммобилизованный фермент инкубировали в кислой среде (рН 4,5) в течение 18 ч при температуре 37 °С, а затем определяли его протеолитическую активность.

Детекцию продуктов ферментативного гидролиза иммуноглобулина осуществляли с помощью электрофореза в полиакриламидном геле с концентрацией геля 10 % в нередуцирующих условиях. Для хроматографии использовали гель SP-Sepharose-XL (Amersham Biosciences).

Показатели токсичности определяли в соответствии с методическими указаниями МУК 4.1/4.2.588-96 [4]. Специфическую активность определяли в реакции нейтрализации на белых мышах. Анализ результатов проводили по методу Reed и Muench [3].

Результаты и обсуждение

Имобилизация пепсина

Выбор метода иммобилизации фермента обусловлен решением следующих задач: фермент должен быть стабильным в условиях протекания реакции; процесс иммобилизации не должен вызывать существенную инактивацию фермента; иммобилизованный фермент должен обеспечивать проницаемость для крупной молекулы иммуноглобулина. На этапе конструирования иммобилизованного фермента применяли адсорбционный и ковалентные методы иммобилизации.

Для адсорбционной иммобилизации в качестве носителя использовали DEAE-целлюлозу. Пепсин, иммобилизованный методом адсорбции, оказался нестабильным. При его инкубации в условиях гидролиза активность снижалась с 5,0 до 3,2 ед./мл.

Метод сополимеризации фермента состоит в поперечном сшивании молекул пепсина. В качестве сшивающего агента был использован глутаровый альдегид. Особенностью метода является отсутствие использования носителей для иммобилизации. Пепсин, поперечно сшитый глутаровым альдегидом, обладал сравнительно высокой активностью (90 ед./г) и стабильностью. После инкубации в условиях ферментативного гидролиза иммуноглобулина активность

фермента повышалась до 138 ед./г. Следует отметить, что данный иммобилизованный фермент отличается низкой механической прочностью, при проведении гидролиза препарат частично растворяется в реакционной среде. Эти недостатки делают невозможным его дальнейшее применение.

Протеолитическая активность препарата иммобилизованного пепсина, полученного осаждением гидроксида титана, составила 9,4 ед./мл. Однако в условиях гидролиза иммуноглобулина активность фермента уменьшалась до 7,6 ед./мл. К недостаткам этого метода следует также отнести трудоёмкость отделения препарата от реакционной смеси: мелкие частицы иммобилизованного фермента полностью не осаждаются при центрифугировании и могут проходить через поры фильтра.

Присоединение пепсина к модифицированному природному силикату с помощью глутарового альдегида не дало стабильных положительных результатов. Однако при иммобилизации пепсина с помощью карбодиимида удалось получить иммобилизованный фермент, который практически полностью сохранял протеолитическую активность в условиях гидролиза иммуноглобулина. Активность фермента составила 4,0 ед./г.

Исследования показали, что пепсин, иммобилизованный на носителе Dowex AG 1X8 с помощью глутарового альдегида, обладал сравнительно высокой активностью (9,1 ед./г), однако препарат оказался недостаточно стабильным: при инкубации иммобилизованного фермента в условиях гидролиза, его активность резко уменьшилась до 6,5 ед./г. Пепсин, присоединенный к Dowex AG 1X8 с помощью карбодиимида, отличался более высокой стабильностью. Первоначальная активность иммобилизованного фермента составляла 11,7 ед./г, после инкубации в условиях гидролиза – 10,4 ед./г.

Пепсин, иммобилизованный на аминокселиагарозе с помощью глутарового альдегида, проявлял высокую протеолитическую активность – 9,4 ед./мл. Препарат оказался стабильным в условиях гидролиза иммуноглобулина: его протеолитическая активность практически не изменилась после инкубации в соответствующих условиях.

В данном исследовании для получения F(ab')₂-фрагментов выбирали фермент с активностью не менее 3–4 ед./мл, поскольку использование менее активных ферментов приводит к значительному увеличению объема твердой фазы в реакционной среде, что затрудняет перемешивание и способствует снижению скорости реакции. Следует отметить, что высокая стоимость носителей иммобилизованных ферментов также ограничивает их применение. Поэтому для проведения гидролиза был выбран пепсин, иммобилизованный на природном силикате с помощью карбодиимида, поскольку данный ферментный препарат достаточно активен, стабилен, а стоимость носителя, необходимого для его получения, минимальна.

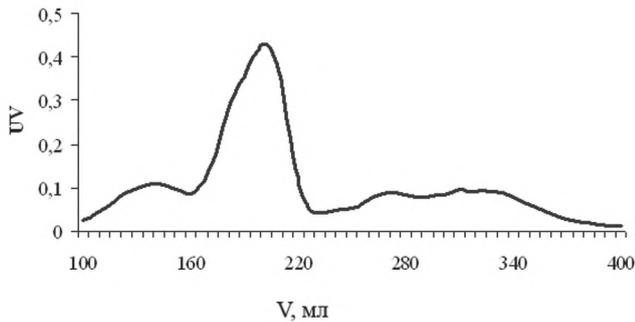


Рис. 1. Профиль элюции продуктов ферментативного гидролиза иммуноглобулина на SP-sepharose-XL

Получение $F(ab')_2$ -фрагментов антирабического иммуноглобулина

Известно, что для получения $F(ab')_2$ -фрагментов иммуноглобулина может быть использован раствор пепсина в соотношении 1:50 – 1:100 (по белку) [1]. Количество иммобилизованного фермента, необходимое для гидролиза иммуноглобулина, определяли по протеолитической активности. Для ферментативного гидролиза 1 г белка требовалось такое количество фермента, которое обеспечивало бы 150–200 единиц протеолитической активности.

Гидролиз проводили в условиях перемешивания иммобилизованного фермента с иммуноглобулином. Реакцию гидролиза проводили при 37 °С, затем останавливали извлечением иммобилизованного фермента из реакционной смеси. Было показано, что наиболее эффективно проведение ферментативного гидролиза в 0,1 М ацетатном буфере (рН 4,5) в течение 24 ч при температуре 37 °С. Оптимальная концентрация иммуноглобулина в реакционной смеси при этом должна составлять 20–30 мг/мл.

Для сепарации $F(ab')_2$ -фрагментов были подобраны условия хроматографического фракционирования продуктов ферментативного гидролиза. Согласно данным литературы, для этих целей широко используется колоночная хроматография на сефадексе, DEAE-целлюлозе, КМ-целлюлозе [1, 7]. В нашей работе использовали колонку размером 5,0 × 30,0 см, заполненную гелем SP-Sepharose-XL. В качестве элюирующего раствора использовали 0,02 М Na-ацетатный буфер, рН 5,5; скорость элюции составляла 4 мл/мин. Такие условия позволяют разделить продукты ферментативного гидролиза на четыре фракции (рис. 1). $F(ab')_2$ -фрагменты элюировали вторым пиком без примеси целых молекул иммуноглобулина или Fc-фрагментов, как было установлено последующим SDS-электрофорезом в полиакриламидном геле (рис. 2). Фракции, содержащие $F(ab')_2$ -фрагменты, стерилизовали с помощью фильтров Minisart (диаметр пор 0,2 мкм) и лиофильно высушивали на установке LZ9C. В настоящей работе целью лиофильного высушивания являлось концентрирование препарата. Лيوфильно высушенный препарат в стерильных условиях растворяли в дистиллированной воде до содержания белка 4,2 %. Значение рН препарата со-

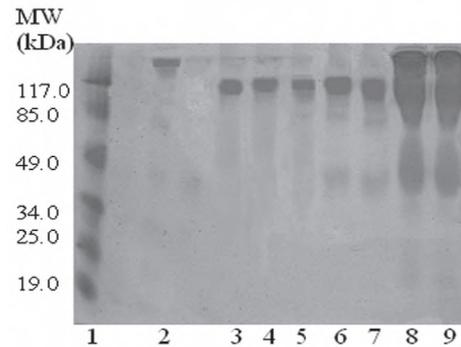


Рис. 2. SDS-ПААГ электрофорез продуктов ферментативного гидролиза антирабического иммуноглобулина:

1 – маркеры молекулярной массы; 2 – антирабический иммуноглобулин (фракция 1); 3–7 – $F(ab')_2$ – фрагменты антирабического иммуноглобулина (фракция 2); 8–9 – гидролизат антирабического иммуноглобулина

ставил 6,7.

Исследование токсичности и специфической активности препарата $F(ab')_2$ -фрагментов антирабического иммуноглобулина

На следующем этапе исследовали токсичность и специфическую активность препарата. Как было установлено при проведении тестов на белых мышах, препарат $F(ab')_2$ -фрагментов антирабического иммуноглобулина является нетоксичным.

При проведении сравнительного изучения активности исходного иммуноглобулина и препарата на основе $F(ab')_2$ -фрагментов в биологической реакции нейтрализации на белых мышах активность препарата $F(ab')_2$ -фрагментов составила 283 МЕ/мл (значение титра специфических антител – 1:2460), в то время как активность исходного препарата нерасщепленного иммуноглобулина составила 359 МЕ/мл (значение титра специфических антител – 1:3119). Согласно фармакопейной статье предприятия, препарат обладает достаточными защитными свойствами, если его активность составляет не менее 150 МЕ/мл.

Таким образом, разработана технология получения препарата на основе $F(ab')_2$ -фрагментов антирабического иммуноглобулина с использованием иммобилизованных ферментов, основными этапами которой являются иммобилизация пепсина, ферментативный гидролиз антирабического иммуноглобулина, хроматографическое отделение $F(ab')_2$ -фрагментов от остатков Fc-части молекулы иммуноглобулина, концентрирование, стерилизующая фильтрация, контроль основных биологических и физико-химических свойств препарата.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Алсынбаев М.М., Исрафилов А.Г., Баталова Т.А. и др. Избранные вопросы сыровоточного производства. Актуальные вопросы разработки, производства и применения иммунобиологических и фармацевтических препаратов. Уфа; 2000. Ч. 1. С. 108–16.
2. Кушманова О.Д., Ивченко Г.М. Руководство к лабораторным занятиям по биологической химии. М.: Медицина; 1983. С. 175–6.
3. Каплан М.М., Копровски Н., редакторы. Методы лабораторных исследований по бешенству. Третье издание. Женева: ВОЗ; 1975. 360 с.

4. Методы контроля медицинских иммунобиологических препаратов, вводимых людям: Методические указания. М.: Информационно-издательский центр Минздрава России; 1998. 128 с.

5. Райхер Л.И., Райхер И.И., Фарцетгер Н.Л. и др., изобретатели. Способ получения иммобилизованного коммерческого пепсина. А.с. № 1730148 СССР, МКИ С12N11/14; 30.04.1992.

6. Chen L., Tsao G. Chemical procedures for enzyme immobilization on porous cellulose beads. *Biotechnol. Bioeng.* 1977; 19 :1463–1473.

7. Hong H., Rooijackers E., Ke N. et al. Methods for the purification of equine rabies immunoglobulin: effects on yield and biological activity. *Biologicals.* 1994; 22 :1–6.

8. Lang J., Attanath P., Quiambao B. et al. Evaluation of the safety, immunogenicity, and pharmacokinetic profile of a new, highly purified, heat-treated equine rabies immunoglobulin, administered either alone or in association with a purified, Vero-cell rabies vaccine. *Acta Trop.* 1998; 70:317–333.

9. Lu J., Guo Z., Han W. et al. Preparation and development of equine hyperimmune globulin F(ab)₂ against severe acute respiratory syndrome coronavirus. *Acta Pharmacol. Sin.* 2005; 26 :1479–84.

10. Puvanakrishnan R., Bose S. Immobilization of pepsin on sand: preparation, characterization and application. *Indian J. Biochem. Biophys.* 1984; 21:323–326.

11. Sannier F., Piot J.M., Guillochon D. et al. Stabilization of pepsin on duolite for continuous hydrolysis of bovine haemoglobin at pH 2 and 40 °C. *Biotechnology techniques.* 1993; 7(1):25–30.

12. Tomono T., Suzuki T., Tokunaga E. Cleavage of human serum immunoglobulin G by immobilized pepsin preparation. *Biochim. Biophys. Acta.* 1981; 660:186–192.

13. WHO Expert Consultation on Rabies: first report. Geneva; 2004. 121 p.

S.V.Generalov, E.G.Abramova, A.K.Nikiforov, E.M.Hramkova, I.A.Shepelev, L.V.Savitskaya, L.N.Minaeva, M.V.Galkina, T.A.Miheeva, N.N.Kochkalova, M.N.Kireev

F(ab)₂-Fragments of Antirabic Immunoglobulin Production Using Immobilized Pepsin

Russian Anti-Plague Research Institute "Microbe", Saratov

Biotechnological scheme for F(ab)₂-fragments of anti-rabies immunoglobulin production using immobilized pepsin was developed. Optimal ways for immobilized pepsin production were determined, conditions for fermentative hydrolysis of anti-rabies immunoglobulin were sorted out. Protective properties of F(ab)₂-fragments of anti-rabies immunoglobulin produced by means of this method were assessed.

Key words: rabies, anti-rabies immunoglobulin, F(ab)₂-fragments, immobilized pepsin.

Поступила 27.05.08.

УДК 616.981.452

В.И.Дубровина, Е.П.Голубинский, С.А.Витязева, Е.Ю.Марков, В.Б.Николаев, Т.А.Иванова, Ж.А.Коновалова, Т.Т.Шкаруба

ВЛИЯНИЕ КОМПЛЕКСНОГО АНТИГЕННОГО ПРЕПАРАТА *YERSINIA PESTIS* EV НА ФУНКЦИОНАЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ КЛЕТОК ФАГОЦИТАРНОЙ СИСТЕМЫ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

ФГУЗ «Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока»

Представлены результаты изучения влияния антигенных комплексов *Y. pestis* EV на функциональную активность клеток фагоцитарной системы морских свинок и белых мышей. Показано, что препарат, приготовленный на основе F1-антигена, мембранной фракции *Y. pestis* EV и иммуномодулятора – арабиногалактана листовницы сибирской (АГ), вызывает повышение функциональной активности клеток фагоцитарной системы экспериментальных животных (морских свинок), усиливает адгезивную и поглотительную способности перитонеальных макрофагов, интенсивность выработки активных форм кислорода и монооксида азота; оказывает стимулирующий эффект на активность миелопероксидазы и синтез неферментных катионных белков полиморфноядерных лейкоцитов. Антигенный комплекс, приготовленный на основе F1-антигена, мембранной фракции *Y. pestis* EV и АГ, обладает стимулирующим действием на цитокининдуцирующую функцию макрофагов белых мышей, что выражается в усилении продукции цитокинов ИЛ-1, ИЛ-6, ФНО-α.

Ключевые слова: *Yersinia pestis*, антигены, фракция 1 (F1), клеточные оболочки, фагоцитоз, неспецифическая резистентность.

Известно, что многие существующие противочумные вакцины, состоящие из убитых или аттенуированных клеток чумного микроба, недостаточно эффективны и способны вызывать поствакцинальные осложнения [3, 5, 15], поэтому разработка высокоэффективных и слабо реактогенных химических вакцин для специфической профилактики чумы весьма актуальна [1]. В связи с возникшей в последнее время угрозой биотерроризма и высокой вероятностью использования чумного микроба в качестве биологического оружия эта проблема приобретает особую значимость [5, 12].

Ранее нами сообщалось о возможности получения за счет обработки живых клеток *Yersinia pestis* EV раствором бактерицидного детергента цетавло-

на комплексного препарата на основе F1-антигена и мембранной фракции, обладающего высокой протективной активностью и иммунобиологическими свойствами в опытах на мышах [7]. Поскольку в механизмах резистентности к чуме важная роль отводится клеточным факторам, большой интерес при формировании поствакцинального иммунитета представляют структурно-функциональные изменения в клетках системы мононуклеарных фагоцитов. В связи с этим цель работы – изучение влияния на функциональную активность фагоцитов экспериментальных животных комплексного антигенного препарата, приготовленного на основе F1-антигена и мембранной фракции клеток *Y. pestis* EV в сочетании с иммуномодулятором – арабиногалактаном (АГ).