

Завірюха Ганна

к.с.-г.н., с.н.с., завідувач відділу

Яненко Уляна

канд. вет. наук, с.н.с., завідувач відділу

Яненко Вячеслав

науковий співробітник

ДНУ «Державний центр інноваційних біотехнологій»

Київ, Україна

СТАНДАРТИЗАЦІЯ БІЛКІВ ЕКЗОТОКСИНІВ ПАТОГЕННИХ МІКРООРГАНІЗМІВ ЗА КОНСТРУЮВАННІ ІНАКТИВОВАНОЇ ВАКЦИНИ НОВОГО ПОКОЛІННЯ

Основні завдання ветеринарної медицини в області наукових знань і практичної діяльності, що спрямовані на попередження виникнення хвороб тварин і їх лікування, полягають у виробництві повноцінних та безпечних у ветеринарному відношенні продуктів тваринництва та захист населення від хвороб, спільних для людей і тварин. Успішне вирішення цих завдань здійснюється методами біотехнології. Активність і стабільність перебування біоб'єктів в активному стані — найважливіші показники їх придатності для тривалого використання в біотехнології та конструюванні нових препаратів [1].

Екзотоксини збудника сибірки, як біотехнологічні об'єкти привертають увагу багатьох науковців різних країн.

Дослідники Sarah Friebe, F. Gisou van der Goot та Jérôme Bürgi (2016), вивчали структури даного токсину, його проникнення до клітин та його імунологічні ефекти [2].

Дослідження захисного фактору антигену та механізму утворення показали, що він може служити новим параметром контролю цитотоксичності [3].

Вивчення комплексної дії екзотоксинів в якості токсичних комплексів, дослідження механізму їх дії на клітину, а саме захисного екзотоксину на фоні дії летального та набрякового токсину [4].

Науковий доробок з вивчення токсину *Bacillus anthracis* (ANTXR1), відомого ще як пухлинний ендотеліальний маркер, показує, що він є висококонсервативним білком поверхні клітини, який експресується згори на судинну систему, що інфільтрує пухлину. Він призводить до порушення росту пухлин людини різної етіології, включаючи меланому, рак молочної залози, товстого кишечника й легень [5].

Практика боротьби з інфекційними захворюваннями свідчить, що ефективними заходами є захист людей і тварин специфічними вакцинами. Специфічних заходів і препаратів щодо лейкозу ще не розроблено, а тому гуманна та ветеринарна медицина веде боротьбу за допомогою паліативних методів.

У ветеринарній медицині співробітниками, ДНУ «Державний центр інноваційних біотехнологій» розроблено препарат «ZG-2011» на основі екзотоксинів сибірської виразки та інших патогенних мікроорганізмів, який формує у щеплених тварин специфічний противірусний імунітет, що захищає велику рогату худобу (ВРХ) від спонтанного зараження вірусом лейкозу [6].

Згідно з нормативною базою України та стандартами Євросоюзу і США, гель-електрофорез включено до процедури контролю якості протеїнових препаратів.

Метою досліджень було проведення дослідження вмісту та розмірів білків екзотоксинів, методом електрофорезу в 10% поліактиламідному гелі. Роботи проводили за програмою – № 01110006386 «Проведення наукових досліджень з метою розробки методів ранньої діагностики, профілактики та лікування інфекційних хвороб, спільних для людей і тварин».

Матеріалом для досліджень були вакцинні штами збудника сибірки та їх метаболіти – *B. anthracis K-79Z*, *B. anthracis 55 ВНИИВУМ*, *B. anthracis СБ*, з колекції музейних культур ДНУ «Державний центр інноваційних біотехнологій». Дослідження розпочинали з отримання чистих від контамінації робочих культур. Кількість мікробних клітин в 1 см³ культуральної рідини становила для *B. anthracis K-79Z* – $30,5 \times 10^6$ КУО, для *B. anthracis 55 ВНИИВУМ* – 114×10^6 КУО, *B. anthracis СБ* – $20,4 \times 10^6$ КУО. Отримані бактеріальні маси з визначеною КУО засівали в рідке поживне середовище Поживний бульйон, з рН 7,5, для кожного штаму окрема емність. Засіви інкубували в термостаті за температури $37,0 \pm 1^\circ\text{C}$ 48 годин. Екзотоксин отримували фільтрацією. Дослідження стерильності фільтратів проводили за ДСТУ 4483:2005 [7]. Титр сибіркового білку в фільтраті визначали за реакцією диск-преципітації (РДП).

За результатами досліджень встановлено титри дослідних екзотоксинів: *B. anthracis K-79Z* – 1:32, *B. anthracis K-79Z* – 1:64, *B. anthracis K-79Z* – 1:128, *B. anthracis СБ* – 1:16, *B. anthracis СБ* – 1:32, *B. anthracis 55* – 1:16. В отриманих екзотоксинах визначали кількісний вміст білку. Визначення кількісного вмісту білку проводили спектрофотометрично з використанням набору Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo scientific). Кількість сумарного білку становила: *B. anthracis K-79Z* – титр 1:32 – 0,39 мг/мл; *B. anthracis K-79Z* – 1:64 – 0,2 мг/мл; *B. anthracis K-79Z* – титр 1:128 – 0,19 мг/мл; *B. anthracis СБ* – титр 1:16 – 0,4 мг/мл; *B. anthracis СБ* – титр 1:32 – 0,56 мг/мл; *B. anthracis 55* – титр 1:16 – 0,5 мг/мл.

Електрофорез білків проводили в 10 % SDS ПААГ. Згідно електрофоретичного розділення та аналізу досліджуваних зразків в ПААГ було виявлено три основні фракції високомолекулярних протеїнів в діапазоні молекулярних мас 110-100 кДа, 90-85 кДа та 85-78 кДа.

Отримані нами результати співпадають із даними літератури, які свідчать що екзотоксин *Bac. anthracis* складається з трьох компонентів: протеїновий антиген – 83 кДа, летальний фактор 90 кДа, набряковий фактор – 89 кДа. У зразках, що містили екзотоксин *B. anthracis K-79Z* (1:32, 1:64; 1:128), найвища концентрація білків екзотоксинів була виявлена у зразку, що мав титр 1:64. Зразок *B. anthracis K-79Z* титр 1:128 має найкращий вміст всіх трьох компонентів, що входить до екзотоксину. У зразках *B. anthracis СБ* – титр 1:32, виявлений протеїн молекулярною масою 85-78 кДа, проте важливо зауважити, що такий самий білок виявлений і у зразку без екзотоксинів, який містив тільки білки поживного середовища в якому вирощувались мікроорганізми.

За результатами досліджень підтверджена відповідність отриманих токсинів – екзотоксинам *B. anthracis*, які складаються з трьох основних фракцій високомолекулярних протеїнів в діапазоні молекулярних мас 110-100 кДа, 90-85 кДа та 85-78 кДа. В перспективі продовження досліджень екзотоксинів та їх впливу на

організм лабораторних тварин.

Список використаних джерел

1. Herasymenko V. H., Herasymenko M. O., Tsvilikhovs'kyi M. I., Kotsyumba I. Ya., Zakharenko M. O., Obrazhey A. F., Holovko A. M. (2006). Biotekhnolohiya [Biotechnology]. Kyiv : Firma «INKOS», 15–20.
2. Friebe S. F., Gisou van der Goot, Bürgi Friebe, J. (2016). The Ins and Outs of Anthrax Toxin. *Toxins*, 8(3), 69. doi:10.3390/toxins8030069.
3. 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. doi:10.1016/j.jmb.2009.07.037.
4. 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. DOI 10.1074/jbc.M109997200.
5. 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. doi: 10.1016/j.ccr.2012.01.004.
6. Zaviryukha A. I., Zaviryukha H. A., Hopka T. B., Dzyuba S. M. (2003). Rezul'taty zastosuvannya vaktsyny Leykozav u profilaktytsi i borot'bi z leykozom velykoyi rohatoyi khudoby [Results of vaccine application Leukozav in the prevention and control of leukemia in cattle]. *Veterinary medicine*. 82. 240–246.
7. Preparaty veterynarni imunobiolohichni. Metody vyznachennya bakterial'noyi i hrybnoyi kontaminatsiyi [Veterinary immunobiological preparations. Methods of determination of bacterial and fungal contamination]. DSTU 4483:2005 (2006). – [Chynnyy vid 2006-01-10]. Kyiv : Derzhspozhyvstandart Ukrayiny, National standard of Ukraine.

