



УКРАЇНА

ДЕРЖАВНЕ
ПАТЕНТНЕ
ВІДОМСТВО

(19) UA (11) 14595 (13) A

(51) 6 A 61 K 35/66; C 12 R 1/16

ОПИС ДО ПАТЕНТУ
НА ВІНАХІДбез проведення експертизи по суті
на підставі Постанови Верховної Ради України
№ 3769-XII від 23.XII. 1993 р.Публікується
в редакції заявника

(54) СПОСІБ КІЛЬКІСНОГО ВИЗНАЧЕННЯ ТОКСИЧНОСТІ ДИФТЕРІЙНОГО ТОКСИНУ

1

(21) 94076203
(22) 12.07.94
(24) 20.01.97
(46) 25.04.97. Бюл. № 2
(47) 20.01.97
(72) Стопчанська Алла Григорівна, Винник
Валентина Дмитрівна, Долеско Юрій Ва-
лерійович
(73) Одеський орден "Знак Пошани" науко-
во-дослідний інститут вірусології та епіде-
міології ім. І.І. Мечнікова (UA)
(57) Спосіб кількісного визначення
токсичності дифтерійного токсину, за-
ключаючий в установленні мінімаль-
ного розведення токсину, викликаючого
цитопатический ефект в культурі кліток

2

HeLa, о т л и ч а ю щ и й с я т е м , ч т о д л я
с к р о ч е н н я с р о к о в и с с л е д о в а н н я і п о в ы -
ш е н н я т о ч н о с т и с п о с о б а , р а з в е д е н н я т о к с и -
н а в о б ъ е м е 1 м л н а н о с я т н а к л е т к и 1 -
с у т о ч н о й к у л ь т у р ы H e L a , о с т а в л я ю т н а 1 ч и
у д а л я ю т , к л е т к и к у л ь т и в и р у ю т п р и 37°C 24
ч , о к р а ш и в а ю т г е м а т о к с и л и н - э о з и н о м , в ы -
я в л я ю т п о в р е ж д е н н ы е т о к с и н о м к л e т к и с
э о з и н о ф и л ь н ы м и я д р ы ш к а м и , а г р e г а ц и е й
и м а р г и н а ц и е й х р о м а т и н а , г р и б о в и д н ы м и
и л и у д л и н е н н ы м и ц и т o п л а з м а т и ч е с к и м и
o т р o с т к а м и и у с т а н а в л я ю т м и н и м а л ь н о е
к о л и ч е с т в о т o k c и н a , в ы з ы в а ю щ е e у к а з а -
н н ы е и з м e н e н и я , ч т о c o o т в e т c t в у e т м и н и -
м а л ь н o й ц и t o п a т и ч e c k o й д o з e и л и 1 Д і м д л я
м o р с к и х c в и н o к .

Изобретение относится к медицине, а
именно иммунологии и бактериологии, и мо-
жет быть использовано для измерения каче-
ства дифтерийного токсина и проверки
полноты его инактивации в дифтерийном
анатоксине.

Разработанный способ может быть ис-
пользован в производственных условиях
при получении дифтерийного токсина, ана-
токсина и противодифтерийной сыворотки,
а также в научных исследованиях для изу-
чения активности токсинообразования штам-
мов дифтерийной палочки и влияния
инактивирующих веществ на токсин.

Проблема борьбы с дифтерией продол-
жает оставаться одной из наиболее актуаль-

ных в здравоохранении, что определяет ис-
ключительную важность получения качес-
твенных противодифтерийных препаратов, в
частности, анатоксинов и антитоксической
сыворотки, используемых для профилактики
и лечения дифтерии.

Одним из важных этапов получения ука-
занных препаратов является измерение ка-
чества дифтерийного токсина и получаемого
из него в результате инактивации формали-
ном дифтерийного анатоксина. Измерение
качества токсинов проводится in vivo на
морских свинках и in vitro по способности
связываться с антитоксинами [1,2,3]. Про-
цесс токсинообразования и качество пол-
учаемого токсина контролируют в

(19) UA (11) 14595 (13) A

биологическом опыте, определяя минимальную смертельную дозу на морских свинках. По данным Левина Я.В. [1] для точного определения D_{50} требуется не менее 30 животных. Автор отмечает необходимость учета индивидуальных отклонений в чувствительности морских свинок к дифтерийному токсину. Продолжительность исследования составляет 8 – 16 дней.

Определение безвредности очищенного концентрированного анатоксина проводят не менее чем на 2-х морских свинках, которые находятся под наблюдением 45 сут. В случае появления у них симптомов специфической интоксикации анатоксин дообезвреживают и повторно проверяют на безвредность [2].

Таким образом, методы биологического тестирования дифтерийного токсина и анатоксина дорогостоящи и продолжительны по времени.

Для удешевления и ускорения контроля указанных препаратов были предприняты попытки использовать методы с применением клеточных культур. При этом токсичность препаратов оценивали по их цитопатическому действию (ЦПД) и влиянию на жизнеспособность клеток [4,5,6]. По мнению Советовой Г.П. и др. [5], методы клеточных культур имеют следующие неоспоримые преимущества перед способами биологического тестирования на животных: точность и быстрота получения ответов, малый разброс данных, меньшая стоимость.

Титрование дифтерийного токсина [4] проводили на различных культурах клеток. Готовили 2-кратные разведения в среде 199 без сыворотки и наносили по 1 мл на клетки, посевная доза последних зависела от индивидуальных особенностей клеточного штамма. Для культуры HeLa она составляла 7×10^4 /мл. Использовали 3-суточную культуру. Изменения монослоя клеток при внесении больших количеств токсина наблюдали спустя 16–18 ч, максимальные повреждения отмечены спустя 72 – 96 ч. Клетки округлялись, разрушались и отслаивались от стекла, отмечали увеличение ядер, зернистость и вакуолизацию цитоплазмы. Авторы показали, что наиболее чувствительной к дифтерийному токсину оказалась культура HeLa. Субтоксическая доза – первое разведение без видимых разрушений клеток – была равна разведению токсина 1:512.

Клеточные культуры были также использованы для выявления токсических свойств коммерческих серий АКДС-вакцины и дифтерийного токсина [5]. Методика исследования была сходной с описанной выше, однако

срок наблюдения был удлинён до 1 недели. Авторы установили, что морфологические нарушения клеток под воздействием токсина и АКДС-вакцины были сходны. Субтоксическая доза вакцины была всего в 4 раза ниже, чем дифтерийного токсина. Высокая токсичность АКДС-вакцины и сходство видимых морфологических изменений с дифтерийным токсином может указывать на сложность дифференциации их с неспецифической дегенерацией при оценке токсичности по избранным Советовой Г.П. и др. [5] критериям: увеличение ядер, вакуолизация цитоплазмы, округление клеток. Авторы считают перспективным изыскание производственных методов контроля различных препаратов лечебного и профилактического значения.

Известен способ титрования дифтерийного токсина по цитопатическому действию [6]. Камзолкина Н.Б. и др. использовали различные культуры клеток, в том числе HeLa. Посевная доза клеток была равна 150–200 тыс. клеток в 2 мл на 1 пробирку. 2–5-кратные разведения токсина в среде 199 с 10% бычьей сыворотки в объеме 2 мл наносили на клеточный монослой, клетки культивировали при 37°C в течение 3 сут с ежедневным просмотром и фиксацией в метиловом спирте с последующей окраской азури-эозином.

ЦПД классифицировали: ++ – повреждение и гибель 100% клеток, +++ – > 50%, ++ – ≈ 50%, ± – < 50%. Действие токсина на культуры клеток HeLa, СОЦ и А наблюдали к концу первых суток, окончательный учет производили на 3 сутки. Пораженные клетки выглядели более темными и округлыми. Минимальное количество токсина, вызывающее ЦПД на (±), колебалось от опыта к опыту в пределах 0,0003 – 0,07 мл.

Недостатки известного способа:

1) вариабельность дозы токсина, вызывающей минимальное ЦПД в различных опытах;

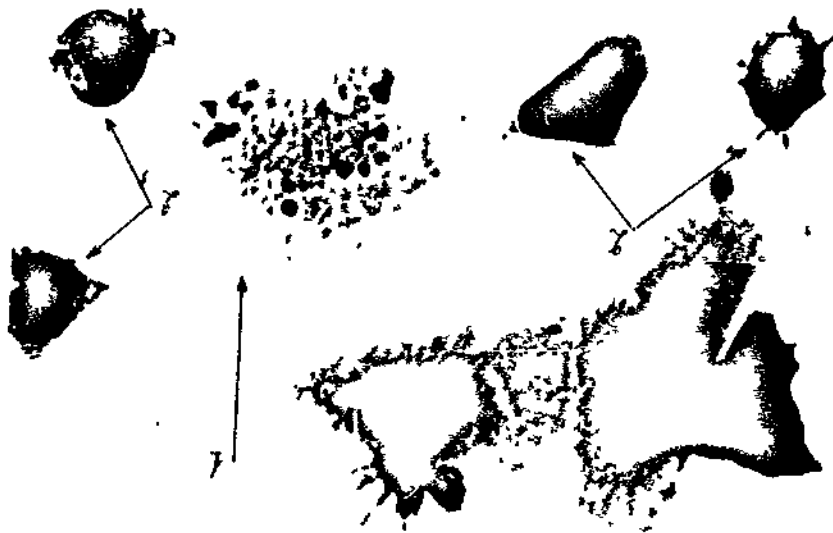
2) продолжительный срок исследования – 7–9 дней (культивирование клеток в течение 4–6 дней до внесения токсина и 3 дня после);

3) трудность дифференциации минимального ЦПД, обусловленного длительным культивированием клеток, и действием токсина;

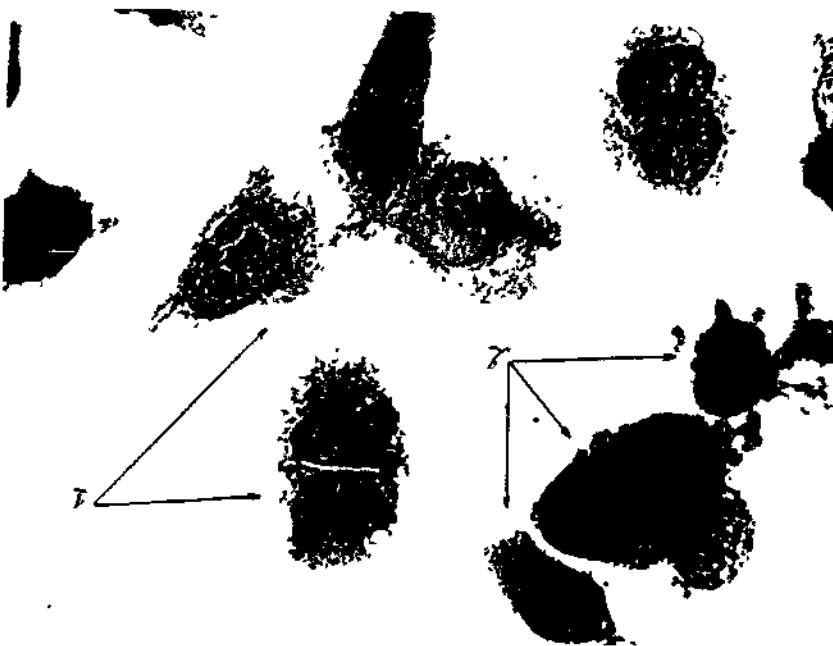
4) отсутствие четкого описания морфологических изменений поврежденных клеток.

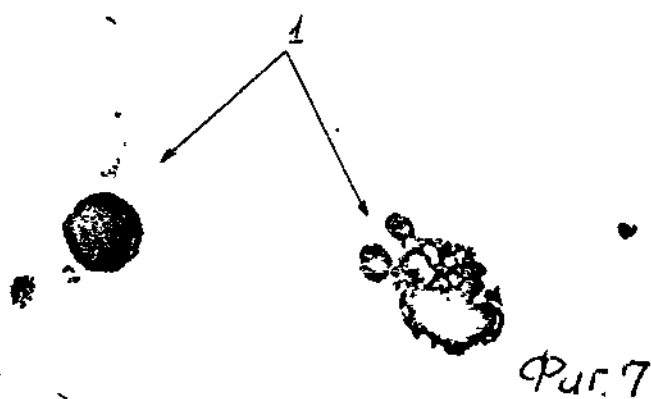
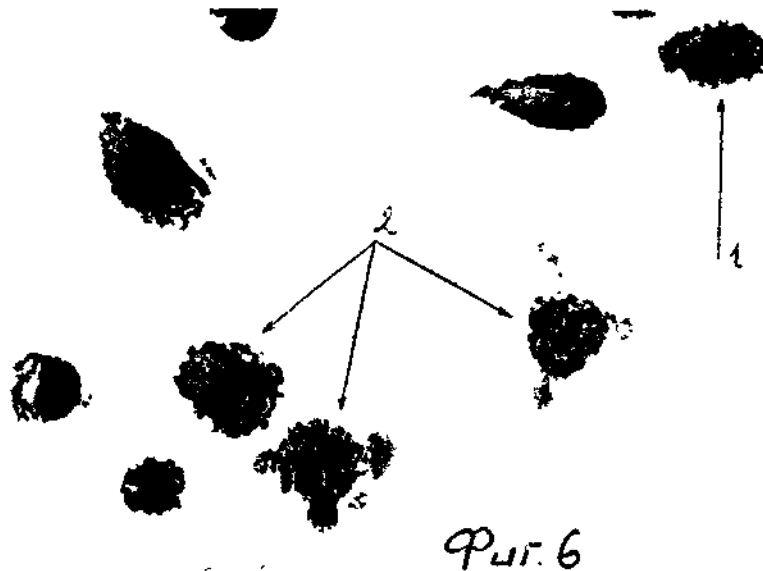
В основу изобретения поставлена задача сократить сроки исследования и повысить точность способа количественного определения токсичности дифтерийного токсина,

part 5



part 4





Упорядник

Техред М.Моргентал

Коректор М. Керецман

Замовлення 4139

Тираж

Підписне

Державне патентне відомство України,
254655, ГСП, Київ-53, Львівська пл., 8



УКРАЇНА

(19) UA (11) 14595 (13) A

(51) 6 A 61 K 35/66; C 12 R 1/16

ДЕРЖАВНЕ
ПАТЕНТНЕ
ВІДОМСТВООПИС ДО ПАТЕНТУ
НА ВІНАХІДбез проведення експертизи по суті
на підставі Постанови Верховної Ради України
№ 3769-XII від 23.XII. 1993 р.Публікується
в редакції заявника

(54) СПОСІБ КІЛЬКІСНОГО ВИЗНАЧЕННЯ ТОКСИЧНОСТІ ДИФТЕРІЙНОГО ТОКСИНУ

1

(21) 94076203
(22) 12.07.94
(24) 20.01.97
(46) 25.04.97. Бюл. № 2
(47) 20.01.97
(72) Стопчанська Алла Григорівна, Винник
Валентина Дмитрівна, Долеско Юрій Ва-
лерійович
(73) Одеський орден "Знак Пошани" науко-
во-дослідний Інститут вірусології та епіде-
міології ім. І.І. Мечнікова (UA)
(57) Спосіб кількісного визначення
токсичності дифтерійного токсину, за-
ключаючись в установленні мінімаль-
ного розведення токсину, викликаючого
цитопатический ефект в культурі кліток

2

HeLa, о т л и ч а ю щ и й с я т е м , ч т о д л я
сокращения сроков исследования и повы-
шения точности способа, разведения токси-
на в объеме 1 мл наносят на клетки 1 –
суточной культуры HeLa, оставляют на 1 ч и
удаляют, клетки культивируют при 37°C 24
ч, окрашивают гематоксилин-эозином, вы-
являют поврежденные токсином клетки с
эозинофильными ядрышками, агрегацией
и маргинацией хроматина, грибовидными
или удлинёнными цитоплазматическими
отростками и устанавливают минимальное
количество токсина, вызывающее указан-
ные изменения, что соответствует мини-
мальной цитопатической дозе или ID₅₀ для
морских свинок.

Изобретение относится к медицине, а
именно иммунологии и бактериологии, и мо-
жет быть использовано для измерения каче-
ства дифтерийного токсина и проверки
полноты его инактивации в дифтерийном
анатоксине.

Разработанный способ может быть ис-
пользован в производственных условиях
при получении дифтерийного токсина, ана-
токсина и противодифтерийной сыворотки,
а также в научных исследованиях для изу-
чения активности токсинообразования штам-
мов дифтерийной палочки и влияния
инактивирующих веществ на токсин.

Проблема борьбы с дифтерией продол-
жает оставаться одной из наиболее актуаь-

ных в здравоохранении, что определяет ис-
ключительную важность получения качест-
венных противодифтерийных препаратов, в
частности, анатоксинов и антитоксической
сыворотки, используемых для профилактики
и лечения дифтерии.

Одним из важных этапов получения ука-
занных препаратов является измерение ка-
чества дифтерийного токсина и получаемого
из него в результате инактивации формали-
ном дифтерийного анатоксина. Измерение
качества токсинов проводится *in vivo* на
морских свинках и *in vitro* по способности
связываться с антитоксинами [1,2,3]. Про-
цесс токсинообразования и качество пол-
учаемого токсина контролируют в

(19) UA (11) 14595 (13) A

биологическом опыте, определяя минимальную смертельную дозу на морских свинках. По данным Левина Я.В. [1] для точного определения LD_{50} требуется не менее 30 животных. Автор отмечает необходимость учета индивидуальных отклонений в чувствительности морских свинок к дифтерийному токсину. Продолжительность исследования составляет 8 – 16 дней.

Определение безвредности очищенного концентрированного анатоксина проводят не менее чем на 2-х морских свинках, которые находятся под наблюдением 45 сут. В случае появления у них симптомов специфической интоксикации анатоксин дообезвреживают и повторно проверяют на безвредность [2].

Таким образом, методы биологического тестирования дифтерийного токсина и анатоксина дорогостоящи и продолжительны по времени.

Для удешевления и ускорения контроля указанных препаратов были предприняты попытки использовать методы с применением клеточных культур. При этом токсичность препаратов оценивали по их цитопатическому действию (ЦПД) и влиянию на жизнеспособность клеток [4,5,6]. По мнению Советовой Г.П. и др. [5], методы клеточных культур имеют следующие неоспоримые преимущества перед способами биологического тестирования на животных: точность и быстрота получения ответов, малый разброс данных, меньшая стоимость.

Титрование дифтерийного токсина [4] проводили на различных культурах клеток. Готовили 2-кратные разведения в среде 199 без сыворотки и наносили по 1 мл на клетки, посевная доза последних зависела от индивидуальных особенностей клеточного штамма. Для культуры HeLa она составляла 7×10^4 /мл. Использовали 3-суточную культуру. Изменения монослоя клеток при внесении больших количеств токсина наблюдали спустя 16–18 ч, максимальные повреждения отмечены спустя 72 – 96 ч. Клетки округлялись, разрушались и отслаивались от стекла, отмечали увеличение ядер, зернистость и вакуолизацию цитоплазмы. Авторы показали, что наиболее чувствительной к дифтерийному токсину оказалась культура HeLa. Субтоксическая доза – первое разведение без видимых разрушений клеток – была равна разведению токсина 1:512.

Клеточные культуры были также использованы для выявления токсических свойств коммерческих серий АКДС-вакцины и дифтерийного токсина [5]. Методика исследования была сходной с описанной выше, однако

срок наблюдения был удлинён до 1 недели. Авторы установили, что морфологические нарушения клеток под воздействием токсина и АКДС-вакцины были сходны. Субтоксическая доза вакцины была всего в 4 раза ниже, чем дифтерийного токсина. Высокая токсичность АКДС-вакцины и сходство видимых морфологических изменений с дифтерийным токсином может указывать на сложность дифференциации их с неспецифической дегенерацией при оценке токсичности по избранным Советовой Г.П. и др. [5] критериям: увеличение ядер, вакуолизация цитоплазмы, округление клеток. Авторы считают перспективным изыскание производственных методов контроля различных препаратов лечебного и профилактического значения.

Известен способ титрования дифтерийного токсина по цитопатическому действию [6]. Камзолкина Н.Б. и др. использовали различные культуры клеток, в том числе HeLa. Посевная доза клеток была равна 150–200 тыс. клеток в 2 мл на 1 пробирку. 2–5-кратные разведения токсина в среде 199 с 10% бычьей сыворотки в объеме 2 мл наносили на клеточный монослой, клетки культивировали при 37°C в течение 3 сут с ежедневным просмотром и фиксацией в метиловом спирте с последующей окраской азури-эозином.

ЦПД классифицировали: ++ – повреждение и гибель 100% клеток, +++ – > 50%, ++ – ≈ 50%, ± – < 50%. Действие токсина на культуры клеток HeLa, СОЦ и А наблюдали к концу первых суток, окончательный учет производили на 3 сутки. Пораженные клетки выглядели более темными и округлыми. Минимальное количество токсина, вызывающее ЦПД на (±), колебалось от опыта к опыту в пределах 0,0003 – 0,07 мл.

Недостатки известного способа:

1) вариабельность дозы токсина, вызывающей минимальное ЦПД в различных опытах;

2) продолжительный срок исследования – 7–9 дней (культивирование клеток в течение 4–6 дней до внесения токсина и 3 дня после);

3) трудность дифференциации минимального ЦПД, обусловленного длительным культивированием клеток, и действием токсина;

4) отсутствие четкого описания морфологических изменений поврежденных клеток.

В основу изобретения поставлена задача сократить сроки исследования и повысить точность способа количественного определения токсичности дифтерийного токсина,

который обеспечил бы раннее выявление характерных структурных изменений клеток и постоянство в установлении минимального количества токсина, способного повреждать клетки.

Поставленная задача достигается тем, что используют 1-суточную культуру клеток HeLa, контакт клеток с разведениями дифтерийного токсина осуществляют в течение 1 ч, клетки культивируют в питательной среде 24 ч и окрашивают гематоксилин-эозином. Это позволяет выявлять четко дифференцируемые морфологические изменения поврежденных токсином клеток, заключающиеся в агрегации и маргинации хроматина, эозинофилии ядрышек, появлении грибовидных или удлинённых цитоплазматических отростков (фиг.1, стр.10, фиг.2, стр.11). Минимальное количество дифтерийного токсина, обуславливающее указанные изменения, является минимальной цитопатической дозой и соответствует 1 Д_{1т} для морских свинок. Продолжительность предлагаемого способа составляет 2 дня.

На фиг.1 показана 2-суточная культура клеток HeLa, контроль, где 1 – ядро, 2 – ядрышко, 3 – цитоплазма. Окраска гематоксилин-эозином. Ув.40.

На фиг.2 показаны цитоморфологические изменения клеток в культуре HeLa после воздействия дифтерийного токсина, где 1 – ядро, 2 – ядрышко, 3 – агрегация хроматина, 4 – маргинация хроматина, 5 – грибовидные цитоплазматические отростки, 6 – удлинённые цитоплазматические отростки. Окраска гематоксилин-эозином. Ув.90.

На фиг.3 показаны цитоморфологические изменения культуры клеток HeLa после воздействия 1 Д_{1т} дифтерийного токсина, где 1 – крупный островок малоизменённых клеток, 2 – повреждённые токсином клетки. Окраска гематоксилин-эозином. Ув.40.

На фиг.4 показаны цитоморфологические изменения культуры клеток HeLa после воздействия 2 Д_{1т} дифтерийного токсина, где 1 – островок малоизменённых клеток, 2 – гнездовое расположение повреждённых токсином клеток. Окраска гематоксилин-эозином. Ув.40.

На фиг.5 показаны цитоморфологические изменения культуры клеток HeLa после воздействия 3 Д_{1т} дифтерийного токсина, где 1 – небольшие островки малоизменённых клеток, 2 – гнездовое расположение повреждённых токсином клеток. Окраска гематоксилин-эозином. Ув.40.

На фиг.6 показаны цитоморфологические изменения культуры клеток HeLa после воздействия 4 Д_{1т} дифтерийного токсина, где 1 – малоизменённая клетка, 2 – повреж-

дённые токсином клетки. Окраска гематоксилин-эозином. Ув.40.

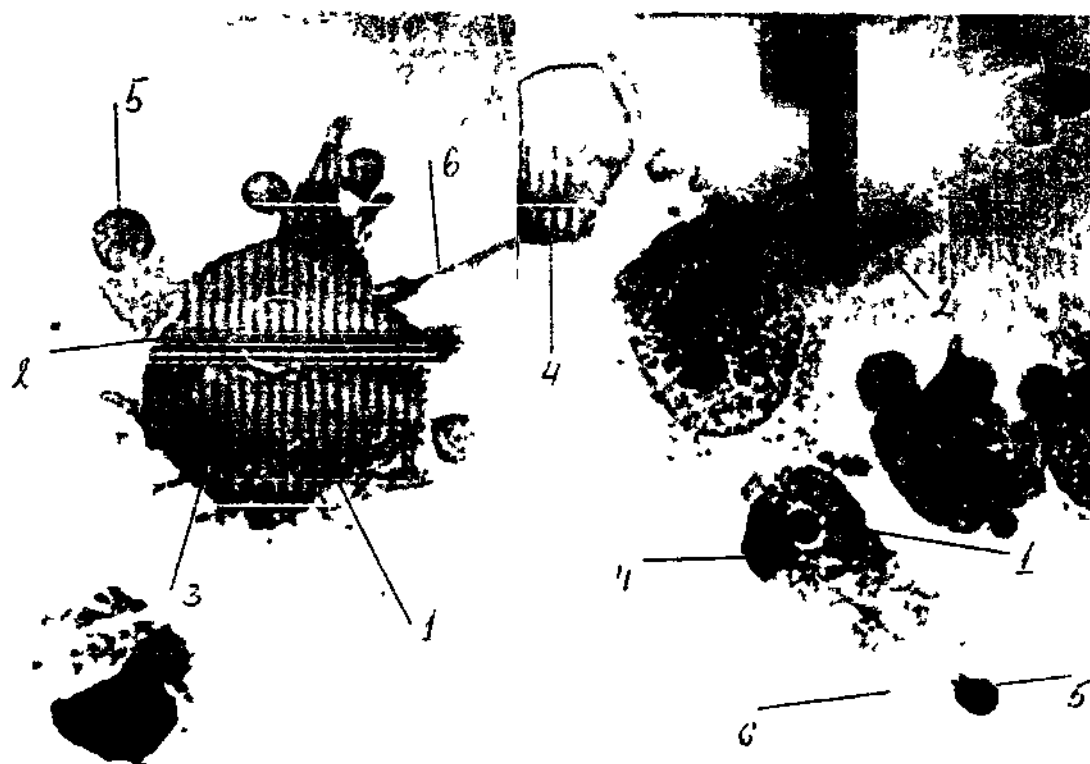
На фиг.7 показаны цитоморфологические изменения культуры клеток HeLa после воздействия 5 Д_{1т} дифтерийного токсина, где 1 – повреждённые токсином клетки. Окраска гематоксилин-эозином. Ув.40.

Способ осуществляют следующим способом

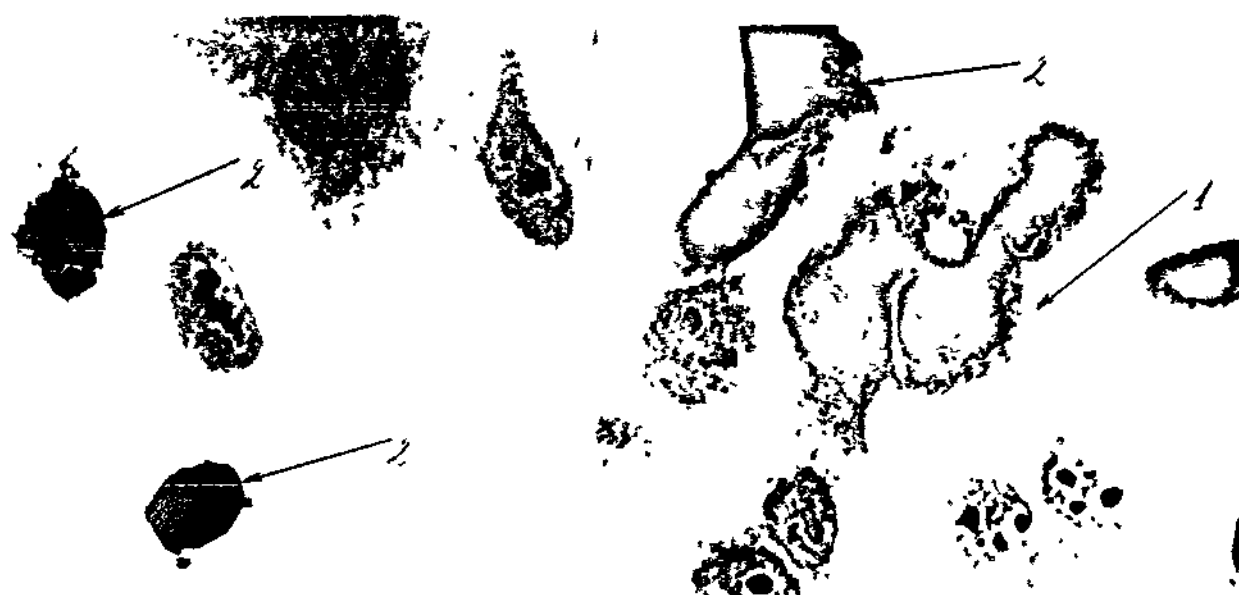
Используют 1-суточную культуру клеток HeLa, выращенную на покровных стеклах в пенициллиновых флаконах при посевной дозе $1,5 - 2 \times 10^5$ клеток/мл. Разведения исследуемого дифтерийного токсина в 1 мл физиологического раствора вносят во флаконы с клетками после удаления ростовой среды. Для каждого разведения используют 4 флакона клеток. Контакт токсина с клетками осуществляют в течение 1 ч при комнатной температуре, затем токсин удаляют, клетки заливают питательной средой, культивируют при 37°C в течение 24 ч, фиксируют в растворе Буэна, окрашивают гематоксилин-эозином и устанавливают минимальную цитопатическую дозу для исследуемого токсина по наличию клеток с описанными выше морфологическими изменениями.

Установлено, что при внесении токсина в количестве, соответствующем 0,5 Д_{1т} для морских свинок, на препарате обнаруживаются единичные поражённые клетки на фоне неизменённого монослоя. Увеличение дозы токсина до 1 Д_{1т} приводит к разрежению монослоя и появлению отдельно лежащих повреждённых клеток по периферии крупных островков неповреждённых клеток (фиг.3, стр.12). Указанная картина морфологических изменений соответствует минимальной цитопатической дозе и не вызывает затруднений при ее определении, поскольку при дозе 2 Д_{1т} появляются гнезда расположенные повреждённые клетки (фиг.4, стр.13), количество которых увеличивается с увеличением дозы токсина (фиг.5, стр.14). Пропорционально уменьшаются размеры островков неизменённых клеток. Резкое снижение числа последних и появление обширных областей повреждённых клеток или свободных от клеток наблюдается при дозе 4 Д_{1т} (фиг.6, стр. 15) и 5 Д_{1т} (фиг.7, стр. 16). Увеличение дозы токсина до 10 Д_{1т} вызывает повреждение практически всех клеток. Минимальная цитопатическая доза для данного конкретного токсина, определяемая в различных опытах, величина малоизменяющаяся.

При титровании производственных серий токсина, активность которых должна составлять примерно 10000 Д_{1т} в 1 мл, готовят



Фиг. 2

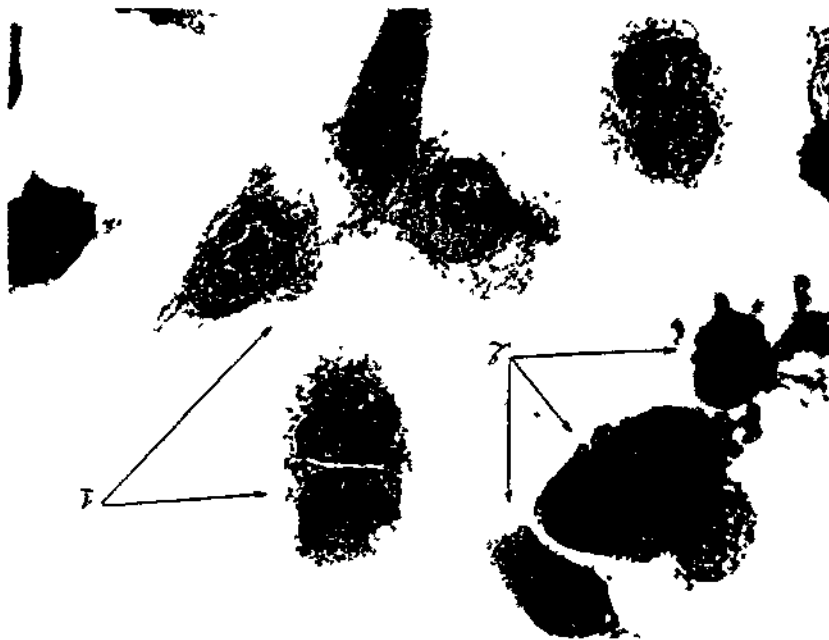


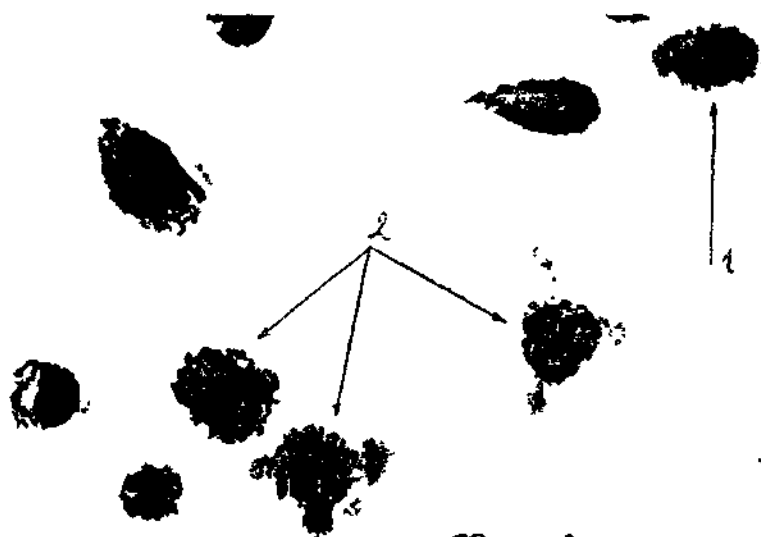
Фиг. 3

pur 5

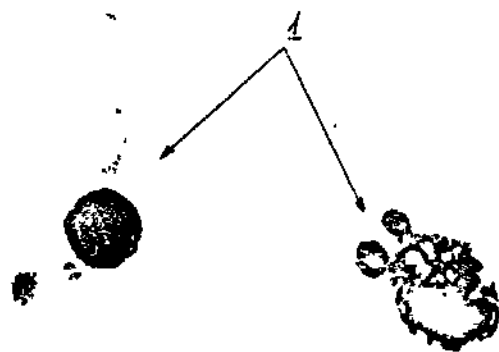


pur 4





Фиг. 6



Фиг. 7

Упорядник

Техред М.Моргентал

Коректор М. Керецман

Замовлення 4139

Тираж

Підписне

Державне патентне відомство України,
254655, ГСП, Київ-53, Львівська пл., 8

Відкрите акціонерне товариство "Патент", м. Ужгород, вул.Гагаріна, 101