

**АНТИТЕЛА ПРОТИВ НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫХ ГУАНИДИНОВЫХ НЕЙРОТОКСИНОВ
КАК СРЕДСТВО ДЕТОКСИКАЦИИ И АНАЛИТИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКИ**

© 2017 В.Г. Кузнецов

Школа биомедицины Дальневосточного федерального университета, г. Владивосток

Статья поступила в редакцию 11.12.2017

Хозяйственная деятельность человека, а также постепенное увеличение средних температур в различных областях мирового океана приводит к изменению традиционных мест обитания морских гидробионтов, в том числе и ядовитых видов. В связи с этим повышается вероятность заражения промысловых видов токсическими веществами. Такими веществами являются гуанидиновые токсины, характеризующиеся сильным нейропаралитическим действием и вызывающие чрезвычайно сильные, вплоть до летального исхода, отравления. Однако отравление тетродотоксином (ТТХ) возможно не только при употреблении морепродуктов. В последнее время ведутся клинические испытания ТТХ в качестве лекарственного препарата. Обладая способностью селективно блокировать потенциал зависимые натриевые каналы, ТТХ может, полностью блокировать передачу нервных сигналов, в том числе и ответственных за болевые ощущения. В текущем проекте используя в качестве объекта мышей линии Balb/c были получены поликлональные антитела к ТТХ и произведена их апробация методом иммуноферментного анализа. Полученные данные позволяют разработать системы детекции и детоксикации нейротоксинов гуанидинового ряда.

Ключевые слова: гуанидиновые токсины, тетродотоксин, иммуноферментный анализ, антитела.

ВВЕДЕНИЕ

Хозяйственная деятельность человека, а также постепенное увеличение средних температур в различных областях мирового океана приводит к изменению традиционных мест обитания морских гидробионтов, в том числе и ядовитых видов. В связи с этим повышается вероятность заражения промысловых видов токсическими веществами. Такими веществами являются гуанидиновые токсины, характеризующиеся сильным нейропаралитическим действием и вызывающие чрезвычайно сильные, вплоть до летального исхода, отравления. К гуанидиновым токсинам относится тетродотоксин (ТТХ) и его аналоги. Наиболее часты случаи отравления ТТХ и его аналогами в странах Юго-Восточной Азии, в Японии, республике Бангладеш и Тайване. Однако, в последнее время некоторые сильно токсичные виды рыб получили широкое распространение в средиземноморском бассейне. Также единичные экземпляры попадают в приложах и в Черном море [1]. ТТХ-подобные токсины были обнаружены не только у токсичных рыб, но и у многих других животных различных таксономических групп, некоторые из которых являются объектами промысловой охоты: рыбы-фугу *Takifugu vermicularis vermicularis*, *Fugu poecilonotus*, *Takifugu niphobles*, сине-кольчатые осьминоги *Octopus maculosus*, мечехвосты *Carcinoscorpius*

Кузнецов Василий Геннадиевич, лаборант-исследователь лаборатории биомедицинских клеточных технологий. E-mail: vas9i-kz@mail.ru

rotundicauda и морские брюхоногие моллюски *Natica lineata* и *Niotha clathrata* [2].

Однако отравление ТТХ возможно не только при употреблении морепродуктов. В последнее время ведутся клинические испытания ТТХ в качестве лекарственного препарата. Обладая способностью селективно блокировать потенциал зависимые натриевые каналы, ТТХ может полностью блокировать передачу нервных сигналов, в том числе и ответственных за болевые ощущения. Например, создаваемый на основе ТТХ препарат для лечения болевого синдрома у раковых больных в некоторых случаях оказывает анальгетический эффект продолжительностью до 2-х недель с момента приема [3]. При этом, из-за высокой токсичности самого ТТХ могут возникать проблемы с подбором правильной дозировки, а так как на данный момент не существует никаких противоядий, то возможны сильнейшие отравления при использовании подобных препаратов.

Таким образом, эффективные и быстрые методы детектирования ТТХ необходимы как при отравлении морскими продуктами питания для обеспечения своевременной медицинской помощи, так и в научно-технологическом процессе для аналитического контроля токсина в различного рода образцах. Одним из таких методов, отличающихся, относительной дешевизной, высокой чувствительностью и селективностью является иммуноферментный анализ - ИФА (ELISA). При этом ИФА позволяет не только обнаружить, но и оценить количественное содержание искомого вещества. Стоит отме-

тить, что используемые в ИФА анализе антитела способны достаточно прочно связывать ТТХ, таким образом в перспективе возможна разработка антител против ТТХ на основе антител. Например, обезвреживание ядов змей, пауков и скорпионов сыворотками антител, уже достаточно давно и успешно применяется в медицинской практике[4].

Цель работы: Используя в качестве объекта мышей линии Balb/c получить поликлональные антитела к низкомолекулярному нейротоксину (тетродотоксину) и произвести их апробацию методом ИФА. Полученные данные позволят разработать системы детекции и детоксикации нейротоксинов гуанидинового ряда.

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЙ

Немертины *Cephalothrix simula* и *Quasitetrastremma stimpsoni* были собраны в ризоидах бурых водорослей *Saccharina sp.*, в заливе Восток залива Петра Великого (Японское море) в июле-августе 2017 г. Немертин содержали в аквариумах с морской водой ($t=4^{\circ}\text{C}$).

Получение экстрактов немертин

Для оценки концентрации гуанидиновых токсинов к пробам немертин *Q. stimpsoni* весом 210 мг и *Cephalothrix simula* весом 47 мг добавляли по 5 мл 0.1 % водного раствора уксусной кислоты и помещали в ультразвуковой гомогенизатор HD 2070 (Bandelin Sonopuls, Германия) на 15 мин, с частотой 20 kHz, амплитудой 228 мкм, с рабочим циклом 0,8 с и интервалом 0,2 с. Полученный гомогенат центрифугировали при 10000 g в течение 10 мин, а затем надосадочную жидкость упаривали в вакуумном испарителе при 50°C . Оставшийся после упаривания осадок доводили 0.1 % водным раствором уксусной кислоты до 1 мл. Раствор затем фильтровали с помощью 3 кДа фильтров Microcon Ultracel YM-3 (Millipore, США). Для удаления белковой фракции раствор нагревали до 85°C в течение 20 мин, затем коагулированные белки осаждали, а супернатант хранили при -80°C для дальнейших исследований.

Получение поликлональных антител против ТТХ

Для получения антигена использовали цитрат ТТХ (Alomone Labs, Израиль). 0,2 мл раствора цитрата ТТХ (1 мг/мл) смешивали с 1 мл раствора БСА (2 мг/мл) в 0,01M фосфатном солевом буфере с 0,15M NaCl (ФСБ) (pH 6,0) и 0,21 мл 8% формалина на ФСБ (pH 7,8). Получившийся раствор инкубировали при 37°C в течение 72 ч при постоянном встряхивании на инкубаци-

онном шейкере (Амоева, Россия). После этого полученный конъюгат очищали от несвязанного ТТХ и остатков формалина диализом против ФСБ (pH 7,2). Сначала диализ проводили при комнатной температуре, делали 2 смены через каждые 3 ч, объем диализного раствора составил 10 мл. Дальнейший диализ проводили при 4°C , делали 4 смены через каждые 12 часов. После диализа определяли концентрацию белка в растворе при помощи УФ-спектрофотометра xMark (Bio-Rad, США) при длине волны 280 нм, концентрацию доводили ФСБ (pH 6,0) до 0,5 мг/мл. Конъюгат хранили при -80°C для дальнейших исследований.

Для иммунизации использовали 10 самцов мышей линии BALB/c. Для первой иммунизации конъюгат смешивали с полным адъювантом Фрейнда в соотношении 1:1. 0,2 мл данной суспензии вводили в мышцу бедра задней лапы животного. Через месяц после первой иммунизации вводили суспензию конъюгата с неполным адъювантом Фрейнда, в соотношение 1:1. Еще через три недели проводили иммунизацию антигеном без адъюванта внутривенно, инъекции повторяли каждую четную неделю. Каждую нечетную неделю проводили отбор иммунной сыворотки. Для этого проводили забор крови из хвостовой вены, добавляя в качестве антикоагулянта 50 мкл раствора гепарина (5000 Ед/мл). От каждой мыши получали по 0,5 мл крови. Кровь центрифугировали ($1000 \times g$, 10 мин, 4°C), отбирали плазму, разбавляли глицерином в соотношении 1:1, хранили при -20°C для дальнейших исследований.

Удаление антител из сыворотки, перекрестно реагирующих с БСА, проводили с помощью аффинной хроматографии на колонке с сефарозой 4B (Sigma-Aldrich, США), ковалентно сшитой с БСА. Сорбент для истощения синтезировали по следующей схеме: к 1,5 г бромциан-активированной сефарозы 4B приливали 40 мл 0,001M соляной кислоты, инкубировали 20 мин, промывали 7 раз избытком соляной кислоты, затем промывали дистиллированной водой 5 раз. К сорбенту приливали 7,5 мл буфера для конъюгирования (0,1M NaHCO_3 , 0,5M NaCl), (pH 8,4), перемешивали, центрифугировали ($300 \times g$, 3 мин, 18°C). Надосадочную жидкость удаляли, к осадку приливали 3 мл буфера для конъюгирования, содержащего 40 мг/мл БСА. Полученный суспензию инкубировали при постоянном перемешивании на мини-рокер-шейкере (Biosan, Латвия) в течение 2 ч при комнатной температуре. Сорбент мягко осаждали ($1000 \times g$, 5 мин, 18°C) и отмывали 8 раз буфером для конъюгирования. Далее к сорбенту приливали 3 мл 2M раствора глицина в буфере для конъюгирования (pH 8,0), перемешивали в течение 2 ч и оставляли на ночь при 4°C . Сорбент отмывали сначала буфером для

конъюгирования, затем 0,1 М ацетатным буфером с 0,5М NaCl (pH 4,0), по 5 раз каждым буфером. Сорбент хранили при 4°C в 0,05 М Tris-HCl, содержащем 1М NaCl (pH 7,5). Иммунную плазму пропускали через колонку, предварительно уравновешенную 0,05 М Tris-HCl, содержащим 0,15 М NaCl, (pH 7,5). Фракцию, не связавшуюся с БСА-Сефарозой, собирали и концентрировали на центриконах Vivaspin turbo 30 кДа MWCO (Sartorius, Германия). Колонку регенерировали, элюируя антитела к БСА 0,1 М глициновым буфером, содержащим 0,15 М NaCl, (pH 2,2).

Для последующего выделения иммуноглобулинов против ТТХ истощенную от антител к БСА и сконцентрированную плазму наносили на колонку с ТТХ, ковалентно связанным с сорбентом Affigel-10 (Bio-Rad, США). Синтез сорбента проводили по следующей схеме: 5 мл Affigel-10 в изопропанолу обрабатывали 50 мкл этилендиамина в 250 мкл ДМФА в течение 30 мин при комнатной температуре. Затем Affigel-10 промывали 50 мМ фосфатным буфером (ФБ, pH 7,4), добавляли 5% глутаровый альдегид (Sigma, США), инкубировали 30 мин при комнатной температуре. От несвязанного глутарового альдегида сорбент отмывали ФБ 10 раз на фильтре Шотта при 20°C. К суспензии сорбента в ФБ добавляли 20 мкг цитрата ТТХ перемешивали и инкубировали 4 часа при 20°C. Несвязанный с носителем токсин отмывали ФБ, как описано ранее. Свободные альдегидные группы инактивировали, инкубируя сорбент 2 часа при 20°C в 5 мл ФБ с 0,1 М NaBH₄. Сыворотку, истощенную от антител к БСА, наносили на колонку с ТТХ, промывали 0,05 М Tris-HCl с 0,15 М NaCl, (pH 7,5). Связавшиеся с ТТХ антитела элюировали глициновым буфером, содержащим 0,15 М NaCl, pH 3,0, затем - тем же буфером с pH 2,2. С целью предотвращения необратимой денатурации иммуноглобулинов элюаты собирали в аликвоту 1,5М Tris-HCl (pH 7,5), для доведения pH до 7,5, затем концентрировали на центриконах Vivaspin turbo, 30 кДа MWCO. Сконцентрированные антитела к ТТХ смешивали с глицерином в соотношении 1:1 и хранили при -20°C для последующих исследований.

Подсчет концентрации ТТХ методом ИФА

Подсчет концентрации ТТХ проводили с помощью конкурентного ИФА, для этого использовали два планшета: первый планшет был сенсibilизирован антигеном, во втором предварительно инкубировали аффинно выделенные антитела к ТТХ с исследуемыми растворами, предположительно содержащими ТТХ и калибровочными растворами ТТХ. Сенсibilизацию 96-луночного планшета (Nunc Maxisorb,

Thermo Fisher Scientific, США) проводили конъюгатом БСА-ТТХ (см. выше) в 0,1 М карбонатном буфере, содержащем 0,15М NaCl (pH 9,5). В каждую лунку добавляли по 100 мкл БСА-ТТХ (4 мкг/мл) и инкубировали в течение 12 ч при 4°C. Затем планшет отмывали от конъюгата по следующей схеме: 4 раза дист. H₂O, затем 1 раз 0,05М Tris-HCl с 0,15М NaCl, 0,005% Triton X-100, (pH 7,5) (ТБС-Тритон-Х-100), затем снова 5 раз дист. H₂O, 5 мин инкубировали с ТБС-Тритон-Х-100 и опять 5 раз дист. H₂O. Затем в каждую лунку добавляли 100 мкл блокировочного раствора, содержащего 1 мг/мл обезжиренного молока в ТБС-Тритон-Х-100 и инкубировали в течение 1ч при 37°C. Во вспомогательный 96-луночный планшет вносили по 120 мкл раствора антител к ТТХ (2 мкг/мл) в отмывочном буфере. Далее в первые лунки каждого ряда вносили по 120 мкл исследуемых экстрактов либо калибровочных растворов ТТХ и проводили серию двукратных разведений до предпоследней лунки ряда. В последние лунки планшета вносили только раствор антител, без ТТХ и использовали их в качестве положительного контроля (бланка). Планшет инкубировали в течение 1 ч при 37°C. Затем содержимое лунок (по 100 мкл) переносили в первый (сенсibilизированный БСА-ТТХ) планшет и инкубировали в течение 1 ч при 37°C. Далее первый планшет отмывали по схеме, описанной выше. Затем в каждую лунку добавляли по 100 мкл раствора антител козы против IgG мыши, конъюгированных с пероксидазой хрена (Thermo Fisher Scientific, США) в ТБС-Тритон-Х-100 в разведении 1:1700, инкубировали 1 ч при 37°C. Планшет отмывали по схеме, описанной выше. Затем в каждую лунку добавляли по 100 мкл раствора ортофенилендиамина в 0,1 М фосфат-цитратном буфере, (pH 5,0), инкубировали в течение 7-12 мин. Реакцию останавливали, добавляя по 50 мкл 5% H₂SO₄ в каждую лунку. Измерение оптической плотности растворов в лунках планшета проводили на планшетном ридере ELx800uv (Bio-Tek Instruments Inc., США) при длине волны 490нм. Концентрацию ТТХ в пробах подсчитывали по калибровочной кривой.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЯ

В настоящее время разработано несколько методологических подходов для детекции ТТХ. Одними из первых и широко применяемых методов выявления ТТХ являются биотесты, включающие биоиспытания на мышах и культуре клеток. Однако эти методы малоинформативны в связи с отсутствием строгой специфичности и высокой индивидуальной изменчивости организмов. Кроме того, метод с использованием животных запрещен в

большинстве развитых стран мира по этическим соображениям. Для количественного и качественного анализа ТТХ часто используют физико-химические методы, основанные на комбинации хроматографии и спектрометрии. Эти методы требуют длительной пробоподготовки и дорогостоящего оборудования, что возможно сделать только в специализированных лабораториях. Иммунологические методы, основанные на использовании антител против ТТХ, используются реже, при этом они являются чувствительными и высокоселективными, позволяя определить наличие токсина и визуализировать токсин в клетках. Использование иммунологических методов является наиболее перспективным направлением для быстрого и дешевого анализа, так как может быть организовано на основе имеющихся диагностических медицинских лабораторий с использованием стандартного оборудования для ИФА.

Проверка работоспособности полученных после аффинной хроматографии антител, проводилась с помощью конкурентного ИФА. В качестве положительного контроля использовался экстракт ТТХ-содержащей немертины *C. simula* [5]. в качестве отрицательного контроля был взят экстракт немертины *Q. stimpsoni*, в которой ТТХ отсутствует [6]. Для построения калибровочного графика использовались разведения коммерческого цитрата ТТХ (Alomone Labs, Израиль) с максимальной концентрацией 2000нг/мл и постепенным понижением до минимальной концентрации 8 нг/мл.

Исходя из полученной калибровочной прямой, была установлена концентрация ТТХ, которая в экстрактах *C. simula* составила около 22,6 мкг/мл, тогда как в экстрактах из немертины *Q. stimpsoni* ТТХ обнаружено не было. Также была установлена предельная чувствительность разработанного метода ИФА к ТТХ, минимальная концентрация обнаруживаемого компонента составила 8-10нг/мл.

Таким образом, в рамках текущей работы нами была разработана быстрая и дешевая система детекции гуанидиновых токсинов на основе антител против ТТХ. Стоит упомянуть, что такие тест-системы экспресс-анализа имеются лишь в некоторых странах Азиатско-Тихоокеанского региона (Китай, Япония, республика Корея и т.д.) ввиду высокого уровня угрозы отравления морскими деликатесами. Разработанный нами экспресс-анализ гуанидиновых токсинов позволит определять концентрацию ТТХ и позволит создать высокочувствительный диагностический инструмент на российском рынке.

Из-за отсутствия противоядий против ТТХ в случаях отравления токсином, к пострадавшим применяется только поддерживающая терапия, направленная на искусственное вентилирова-

ние легких до полного выведения токсина из организма. Создание биологической системы детоксикации на основе антител против ТТХ и его аналогов может означать появление в мировой практике нового подхода к лечению отравления гуанидиновыми токсинами. В ряду работ показаны положительные результаты использования антител в качестве защиты от токсического эффекта ТТХ. Так, внутривенное введение поликлональных антител к ТТХ экспериментальным животным полностью ингибирует воздействие летальной дозы тетродотоксина и сакситоксина [7]. Апробированный нами метод получения антител против ТТХ в дальнейшем будет использован для разработки лекарственных препаратов против отравления гуанидиновыми токсинами.

ВЫВОДЫ

Были получены поликлональные антитела против тетродотоксина, которые были успешно нами применены для его детекции в биологических образцах методом конкурентного иммуноанализа. Апробированный нами метод получения антител против ТТХ в дальнейшем будет использован для разработки лекарственных препаратов против отравления гуанидиновыми токсинами.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Находка *lagocephalus sceleratus* (gmelin, 1789) (osteichthyes, tetraodontidae) в Чёрном море в Севастопольской бухте, Крым / А.П. Болтачев, Е.П. Карпова, В.В. Губанов, М.П. Курин // Морской экологический журнал. 2014. Т. 13. № 4. С. 14.
2. Tetrodotoxin: Chemistry, Toxicity, Source, Distribution and Detection / V. Bane, M. Lehane, M. Dikshit, A. O'Riordan, A Furey // Toxins. 2014. V. 6. P. 693 - 755.
3. Tetrodotoxin, an Extremely Potent Marine Neurotoxin: Distribution, Toxicity, Origin and Therapeutical Uses / J. Lago, L. P. Rodríguez, L. Blanco, J. M. Vieites. A.G. Cabado // Marine Drugs. 2015. V. 13. P. 6384-6406.
4. Antidotes against venomous animals: State of the art and prospectives / G.P. Espino-Solis, L. Riaño-Umarila, B. Becerril, L.D. Possani // Journal of proteomics. 2009. V. 72(2). P. 183 - 199.
5. Paralytic toxicity in the ribbon worm Cephalothrix species (Nemertea) in Hiroshima Bay, Hiroshima Prefecture, Japan and the isolation of tetrodotoxin as a main component of its toxins / M. Asakawa, T. Toyoshima, K. Ito, K. Bessho, C. Yamaguchi, S. Tsunetsugu, Y. Shida, H. Kajihara, S. Mawatari, T. Noguchi, K. Miyazawa // Toxicon. 2003. V. 41 P. 747-753.
6. Zaslavskaya N. I., Akhmatova A. F., Chernyshev A. V. Allozyme comparison of the species and colour morphs of the nemertean genus Quasitetrostemma Chernyshev, 2004 (Hoploneurtea: Tetrastemmatidae) from the Sea of Japan // Journal of Natural History.

2004. V. 44. P. 2303-2320.
7. Toxin-neutralizing effect and activity-quality relationship for mice tetrodotoxin-specific polyclonal antibodies / *Qin-Hui Xua, Chang-Hua Wei, Kai Huang, Kang-Tai Rong* // *Toxicology*. 2005. V. 206. P. 439–448.

**ANTIBODIES AGAINST LOW-WEIGHT GUANIDINE NEUROTOXINS
AS AN INSTRUMENT OF DETOXICATION AND ANALYTICAL DIAGNOSTIC**

© 2017 V.G. Kuznetsov

School of Biomedicine of Far Eastern Federal University, Vladivostok

Human economic activity, as well as a gradual increase of average temperatures in various areas of the world's oceans leads to a change of the traditional habitats of marine hydrobionts, including poisonous species. This probably leads to contamination of commercial species with toxic substances, such as guanidine toxins - substances with a strong neuromuscular effect, up to lethal outcome. Tetrodotoxin (TTX) used as a drug in medicine also causes poisoning in case of overdose. A unique feature of TTX is its ability to block Voltage-gated sodium channels exclusively in nerve and muscle cells, without affecting the transmembrane sodium flows in non-excitabile tissues, thus providing normal metabolism and general osmoregulation of the organism. In the current project, polyclonal antibodies against TTX were made in Balb/c mice and approbation of antibodies was performed by Competitive enzyme-linked immunosorbent assay. The obtained data will allow to develop systems of detection and detoxication of guanidine neurotoxins.

Keywords: guanidine toxins, tetrodotoxin, enzyme linked immunosorbent assay, antibodies.