

MEDYCYNĄ WETERYNARYJNĄ

ORGAN POLSKIEGO TOWARZYSTWA NAUK WETERYNARYJNYCH

CZASOPISMO POSWIECONE NAUCIE I PRAKTYCE WETERYNARYJNEJ
ZAŁOŻONE W 1945 R. PRZEZ WYDZIAŁ WETERYNARYJNY W LUBLINIE

REDAKCJA

Redaktor naczelny: prof. dr Edmund PROST

Członkowie Komitetu Redakcyjnego: prof. dr Ryszard BADURA, prof. dr Jerzy MAZURCZAK,
prof. dr Abdon STRYSZAK, prof. dr Stanisław WOŁOSZYN

Sekretarz naukowy: dr Elżbieta PEŁCZYŃSKA

RADA PROGRAMOWA

Dr Anatol BACHAREWICZ, prof. dr Henryk BALBIERZ, prof. dr Władysław BIELAŃSKI, prof. dr
Stanisław CAKAŁA, prof. dr Zygmunt EWY, prof. dr Roman HOPPE, prof. dr Lech JĄSKOWSKI, płk. prof.
dr Stefan KOSSAKOWSKI, prof. dr Zdzisław LARSKI, dyr. dr Henryk LIS, doc. dr Władysław
LUTYŃSKI, prof. dr Wiktor STEFANIAK, prof. dr Marian TRUSZCZYŃSKI, prof. dr Janusz WELENTO,
prof. dr Eugeniusz ŻARNOWSKI

CHOROBY ZAKAŻNE I INWAZYJNE

ZYGMUNT CYGAN

Współczesne poglądy na strukturę molekularną toksyny botulinowej

Z Zakładu Higieny Weterynaryjnej w Lublinie

Toksyna botulinowa (jad kiełbasiany, botulina) stanowi pod względem fizyko-chemicznym specyficzny rodzaj molekuł białka o właściwościach jednej z najsilniejszych trucizn (2, 50). Niezależnie od typu antygenowego wykazuje ona w stanie oczyszczonym zbliżoną aktywność biologiczną, ściśle określoną oporność na enzymy trawienne jelit oraz identyczne działanie, polegające na zaburzeniu przewodnictwa impulsów w synapsach nerwowo-mięśniowych (53). Jedność funkcjonalna tych jadów sugeruje wspólną u nich konfigurację struktury (8). Dzięki ostatnim pracom poznano lepiej fizyczną budowę oraz niektóre chemiczne uwarunkowania toksyczności tego niezwykłego białka (34, 37, 43, 57). Przedstawienie tej problematyki z uwzględnieniem najnowszego piśmiennictwa jest celem niniejszego artykułu.

Typy toksyn botulinowych

Aktualnie wyróżnia się 7 typów antygenowych (A, B, C, D, E, F i G) oraz 2 podtypy (C alfa i C beta) toksyn botulinowych (6, 22, 23, 27, 53). Podkreślić przy tym należy, że w powyższej klasyfikacji nie jest ujęty tzw. szczep „84”,

który wytwarza botulinę złożoną z 93% jadu typu A i 7% F (22). Według Jansena (27) botulina C alfa, oprócz wspólnej i jedynej dla C beta aktywowanej trypsyną komponenty C2, wykazuje jeszcze czynnik C1, a także składnik D jako wyłączny czynnik toksyny typu D. Natomiast Eklund i Poysky (15) podają, że czynnik C2 jest stwierdzany zarówno w toksynie szczepów C jak i D. Pewne zróżnicowanie antygenowe wydaje się zaznaczać również pomiędzy jadami szczepów typu B tj. proteolitycznego „Okra” i nieproteolitycznego „QC” (52). Wspomnieć też trzeba o serologicznym związku botulin E i F. Smith i Holdeman (53) uważają, że duże koncentracje antytoksyny E neutralizują małe dawki toksyny F.

Synteza powyższych jadów nie jest kierowana przez genom zarazka, lecz wiąże się z zakażeniem komórki specyficznym bakteriofagiem (16, 17). Zdaniem Eklunda i Poysky’ego (15) jedynie wytwarzanie składnika C2 ma zależeć od genów bakterii. Ostatnio stwierdzono lizogenną konwersję fagową botulin C i D (16, 25, 40), a także ich hemaglutynin (39). Ponadto ustalono, że hemaglutyniny typów A i B wykazują pewne antygenowe pokrewieństwa (11, 49).

Botuliny są syntetyzowane w najwyższej koncentracji pod koniec fazy logarytmicznego wzrostu zarazka (53). Jednak początkowa ich aktywność jest na ogół niska i dopiero wzrasta u szczepów proteolitycznych (typy A, B i F) w wyniku endogennej aktywacji przez wytwarzane proteazy bakteryjne (10, 13, 26), a u szczepów nieproteolitycznych (B, E, F i G) po zadziałaniu enzymów pozabakteryjnych (12, 13, 18).

Definicja progenitora i pochodnej toksyny

Lamanna i Sakaguchi (36) dla określenia powstających toksyn macierzystych wprowadzili pojęcie progenitora („progenitor toxin”) w miejsce kwestionowanego przez Dolmana i Gerwing (14) terminu protoksyny. Obecnie nazwę protoksyny stosuje się najczęściej przy jadach *Cl. perfringens* D i E dla zaakcentowania powstających pod wpływem proteaz w pełni aktywnych produktów z nieczynnych substancji (tzw. aktywacja jakościowa — „qualitative activation”), co występuje np. w przypadku toksyny epsilon (60) i jota (45). W ujęciu Lamanny i Sakaguchi (36) progenitor botuliny stanowi mniej toksyczną substancję macierzystą w rozumieniu jednocy genetycznej z pochodną toksyną („derivative toxin”) o silnej aktywności biologicznej. Termin ilościowej aktywacji („quantitative activation”) progenitora dotyczy wywołanego przez trypsynę wzrostu preegzystującej toksyczności w cząsteczce jadu, jako rezultatu enzymatycznego usunięcia substancji maskujących toksyczną komponentę lub spowodowanych przemian w jej wewnętrznej strukturze (21, 36). Odnosi się to do botuliny uczynianej przez proteazy w hodowli laseczek proteolitycznych A, B, i F oraz do aktywowanego trypsyną „*in vitro*”, a przypuszczalnie i „*in vivo*” jadu nieproteolitycznych szczepów B, E i F. Zupełnie inny charakter posiada proces określony przez Lamannę i Sakaguchi (36) jako

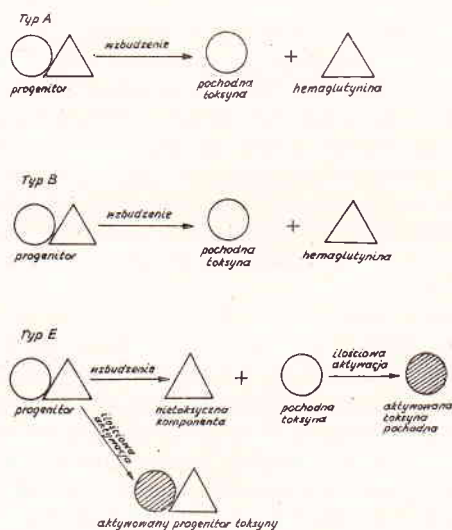
tzw. wzbudzenie („enhancement”). Polega on na dysocjacji progenitora toksyny (zwykle w warunkach słabo zasadowego pH i przy sile jonowej 0,13), prowadzącej do powstania odrębnych komponent toksycznych i nietoksycznych, — czemu towarzyszy niewielki wzrost biologicznej aktywności (47). Powyższe uwolnione komponenty neurotoksyny stanowią tzw. pochodną toksynę („derivative toxin”). Istotę odnośnych procesów przedstawił schematycznie na ryc. 1.

Struktura molekularna progenitorów botuliny

Obecnie przyjmuje się, że progenitory jadu botulinowego przedstawiają wielkość cząsteczkową związki białka o charakterze agregatów (kompleksów), składających się z połączonych wiązaniami niekowalencyjnymi 2—3 komponent tj. neurotoksycznej, nietoksycznej i hemaglutyniny (36, 37, 41, 55). Stwierdzone różnice pomiędzy progenitorami poszczególnych typów toksyny botulinowej najczęściej dotyczą ciężaru molekularnego (CM), współczynnika sedymentacji (S) oraz ilości i rodzaju komponent.

Według badaczy japońskich Kozaki i wsp. (34) oraz Sugii i Sakaguchi (56) progenitor botuliny A nie jest jednolity i w hodowli zarazka pojawia się z 3 formach (frakcjach) jako molekule duże LL („large — large”) i L („large”) oraz średnie M („medium”). Zostały one szczegółowo przebadane w oczyszczonej toksynie proteolitycznego szczepu „Halla” przy zastosowaniu żelfiltracji przez Sefadeks G — 200 o pH 3 i następnie przy ultrawirówaniu w 5—20% gradiencie sacharozы z dodatkiem 1 M NaCl. Toksyna A — LL ze współczynnikiem sedymentacji 19 S posiadała toksyczność $2,5\text{--}3,0 \times 10^8$ LD₅₀/mg N, podczas gdy A — L o 16 S cechowała wyższa aktywność $5,0\text{--}5,5 \times 10^8$ LD₅₀/mg N (56, 57). Frakcja najlżejsza A — M o 12 S i biologicznej mocy $4,5\text{--}5,5 \times 10^8$ LD₅₀/mg N była jednolita w warunkach elektroforezy i ultrawirówania przy pH 8 (56). Zdaniem Kozaki i wsp. (34) toksyczność frakcji M szczepu „Halla” jest nieco wyższa i wynosi $5,0\text{--}6,0 \times 10^8$ LD₅₀/mg N. Przypuszczalny model progenitorów toksyny botulinowej A jest podany na ryc. 2. Wynika z niej, że toksyny A — LL i A — L składają się z 3 komponent tj. neurotoksycznej oraz 2 nietoksycznych składników, z których jeden wykazuje właściwości hemaglutyniny (5, 35, 58), a drugi jest pozbawiony tej aktywności (56, 58). Według DasGupta i Boroffa (7) odnośne hemaglutyny występują w 3 formach agregacji tj. o CM 290 000, 500 000 i 900 000 daltonów. Natomiast cząsteczki progenitora A — M zawierają 2 jednakowej wielkości molekularnej komponenty, a mianowicie neurotoksyczną i nietoksyczną. Ta ostatnia w dawce badawczej 184 ug/ml nie wykazywała właściwości hemaglutynacyjnych (34).

Inni badacze uzyskali zbliżone wyniki badań nad strukturą molekularną progenitorów toksyny A. Schantz i Spero (51) dowiedli obecności



Ryc. 1. Przebieg aktywacji i dysocjacji progenitorów botuliny wg Lamanny i Sakaguchi (36)

jadu o cząsteczkach 19 S w kilkudniowych hodowlach *Cl. botulinum* A. Również Hauschild i Hilsheimer (24) stwierdzili botulinę o molekułach 200 000 i 500 000 daltonów w płynach kultury i w ekstraktach powyższych lasetek. Jak przypuszczają Sugii i Sakaguchi (55) pierwsza z nich mogła odpowiadać formie molekularnej M, a druga L.

Poglądy na tworzenie się form M i L botulin nie są zgodne. Według Sugii i Sakaguchi (56) najpierw pojawiają się cząsteczki 12 S (M), które po usunięciu pewnych niskomolekularnych substancji, są przekształcane w molekuły 16 S (L). Natomiast molekuły 19 S mają być dimerem cząsteczek 16 S (55). Stąd też Sugii i Sakaguchi (55) nazwę progenitora dla toksyny A ograniczają tylko do jej formy M. Natomiast Kozaki i wsp. (33) w swoich rozważaniach odrzucają możliwość procesu agregacji i dezagregacji toksyn L i M. W ich ujęciu jady L i M przedstawiają produkty syntezy bakteryjnej nie podlegające wtórnym przemianom.

Podobnie progenitory toksyny botulinowej typu B są wytwarzane w 2 formach molekularnych tj. L o współczynniku sedymentacji 16 S i aktywności $2,5-3,0 \times 10^8$ LD₅₀/mg N oraz M z 11,5 S i toksycznością $5,5-6,5 \times 10^8$ LD₅₀/mg N (34, 46). Sakaguchi i wsp. (46) określili ciężar molekularny jadu B — L na 500 000, a B — M na 350 000. Podkreślić należy, że podobne cząsteczki toksyczne wykazano zarówno w hodowli proteolitycznego szczepu „Okra” jak i nieproteolitycznego „QC” (33). W skład botulin B — L i B — M wchodzi komponenta neurotoksyczna o identycznym ciężarze molekularnym (CM) oraz składnik nietoksyczny o różnym CM (ryc. 2). Zdaniem Kozaki i wsp. (33) nietoksyczna komponenta B — szczepu proteolitycznego „Okra” może zawierać 2 podjednostki, z których jedna

posiada podobieństwo antygenowe ze składnikiem nietoksycznym progenitora B — M, a druga jest odmienna i wykazuje właściwości hemaglutyniny. Powyższe składniki nietoksyczne są pomiędzy sobą bardzo silnie powiązane i jak dotychczas nie udało się ich rozdzielić. Ich stosunek ilościowy do składnika toksycznego zależy od wielkości cząsteczek botuliny i w przypadku formy M wynosi 1:1, a L od 4:1 do 7:1 (34).

Komponenty hemaglutynacyjne botulin typu A i B wykazują wzajemne pokrewieństwa antygenowe. Miejscem ich działania są pewne ugrupowania cukrowe na powierzchni erycytów. Balding i wsp. (1) oraz DasGupta i Sugiyama (11) przyjmując za podstawę identyfikacji tych grup stopień zahamowania hemaglutynacji przez odpowiadające im cukry — przypisują ważną w tym względzie rolę D-galaktozie oraz niektórym jej pochodnym.

Spośród jadów botulinowych posiadających największe znaczenie w patologii zwierząt przebadano jeszcze najpełniej budowę progenitora D (37). Natomiast jedyna praca Syuto i Kubo (59) nad konfiguracją cząsteczki toksyny C była tematycznie zawężona do komponenty toksycznej. Dlatego przechodząc od razu do przedstawienia struktury molekuły D należy na wstępie podkreślić, że zasadniczo nie różni się ona od cząsteczek omówionych już wyżej jadów. Ostatnio Miyazaki i wsp. (37) dowiedli, że oczyszczony progenitor botuliny D szczepu „CB16” o właściwościach hemaglutynacyjnych, występuje pod postacią toksyn L i M, a szczepu „1873”, pozbawionego działania hemaglutynacyjnego, — jedynie w formie M. Aktywność frakcji D — L wynosiła $2,4 \times 10^8$ LD₅₀/mg N, a D — M 5×10^8 LD₅₀/mg N. Elektroforeza jadu L w żelu poliakrylamidowym przy pH 4 ujawniła 3 — 4 linie, a w przypadku toksyny M — 2 linie. W związku z tym wysunięto pogląd, że w skład molekuł D — L wchodzi 3 komponenty tj. neurotoksyczna, nietoksyczna oraz hemaglutynacyjna, podczas gdy cząsteczki D — M są pozbawione hemaglutyniny.

Botuliny typu E są to antygeny toksyczne, głównie szczepów nieproteolitycznych, a wyjątkowo także ich mutantów proteolitycznych (38). Występujący w hodowlach tych szczepów wysokocząsteczkowy progenitor, o względnie niskiej aktywności, wynoszącej według Kitamury i wsp. (30) 9×10^4 LD₅₀/mg N, podlega uczynieniu trypsyną z powstaniem aktywowanego progenitora o mocy $4,7-8,0 \times 10^7$ LD₅₀/mg N (ryc. 2). Odnosne wartości toksyczne dla szczepu „VH” wyniosły zgodnie z Sakaguchi i wsp. (48) $5,1 \times 10^5$ LD₅₀/mg N oraz $8,3 \times 10^7$ LD₅₀/mg N. Podobnie Sakaguchi i Sakaguchi (47) w przypadku niemieckiego szczepu „35396” stwierdzili, że toksyczność pierwotnego progenitora po zadziałaniu krystaliczną trypsyną w dawce 0,2 mg/ml — wzrastała przeszło 100 krotnie tj. z $2,9 \times 10^5$ LD₅₀/mg N do $3,3 \times 10^7$ LD₅₀/mg N.

Typ	Forma molekularna	Wartość S	Toksyczność ($\times 10^{-3}$ LD ₅₀ /mg N)
A	LL	19,0	25-30
	L	16,0	
	M	12,0	50-55
B	L	16,1	25-30 ^{a)}
	M	11,5	55-60
E		11,6	5-8
F		10,3	10-15

Objaśnienia:

-  - komponenta neurotoksyczna o pełnej aktywności
-  - komponenta neurotoksyczna niemożliwa aktywacji
-  - komponenta nietoksyczna
-  - hemaglutynina
- ^{a)} - toksyczność po aktywacji

Ryc. 2. Struktura molekularna progenitorów botulin wg Kozaki i wsp. (34)

Według Sakaguchi i Sakaguchi (47) progenitor E, niezależnie od formy aktywności zawiera jednakowej wielkości cząsteczki. Charakteryzują się one współczynnikiem sedimentacji 11,6 S (29) oraz ciężarem molekularnym 350 000 daltanów (30). W tym względzie odmienny jest pogląd Gerving i wsp. (19) wskazujący, że w trakcie trypsynowania dochodzi do fragmentacji dużych molekuł toksyny.

Toksyna botulinowa F, uzyskana z hodowli proteolitycznego szczepu „Langeland” występuje wyłącznie w formie aktywowanej i jest pozbawiona właściwości hemaglutynacyjnych (41). Jak podają Ohishi i Sakaguchi (41, 42) posiada ona współczynnik sedimentacji 10,3 S oraz ciężar molekularny 235 000. Należy więc do progenitorów posiadających najmniejsze cząsteczki. Natomiast pod względem toksyczności wynoszącej $1,2 \times 10^8$ LD₅₀/mg N nie odbiega od aktywności progenitorów innych typów (41). Progenitor F w odczynie żelprecypitacji tworzy 2 odrębne linie, które odpowiadają komponentom neurotoksycznej i nietoksycznej (ryc. 2).

Reasumując powyżej przedstawione zagadnienie należy stwierdzić, że struktura molekularna poszczególnych progenitorów wykazuje wiele wspólnych cech. Również ich toksyczność po ostatecznej aktywacji jest bardzo zbliżona.

Struktura komponenty neurotoksycznej

Oczyszczone toksyny botulinowe poniżej punktu izoelektrycznego 5,6 i w pH 4 zachowują się jako jednolite białka (28, 50). Natomiast przy kwasowości ponad pH 7,3 i sile jonowej wyższej niż 0,13 (62) podlegają procesowi dysocjacji z oddzieleniem się różnych składników, w tym również komponenty neurotoksycznej stanowiącej tzw. pochodną toksynę („derivative toxin”). Może być ona wykazana metodą ultrawierowania w pH 7,3 (50, 61), chromatograficznie na DEAE celulozie (7, 24) oraz elektroforetycznie w żelu poliakrylamidowym (37). Podkreślić należy, że siła wiązań międzykomponentowych w cząsteczkach różnych botulin jest niejednakowa. Dotychczas np. nie udało się rozdzielić złożonej komponenty nietoksycznej w cząsteczkach toksyn A — L i B — L (34).

Komponenty toksyczne różnych botulin posiadają podobny ciężar molekularny, który wynosi dla szczepu „Halla” typu A 145 000 (7, 55), szczepów „Lamanna” i „Okra” B 167 000—170 000 (2, 32), „Sztokholm” C 141 000 (59), „1873” D 170 000 (37), „Alaska” E 147 000 (8) oraz „Langeland” F 155 000 (63, 64). Również współczynnik sedimentacji tej komponenty, niezależnie od typu jadu, posiada jednakową wartość 7 S (34, 55). Jedynie w przypadku szczepu typu F współczynnik ten został określony na 5,9 S (42) oraz 6,4 S (46).

Aktywność biologiczna niskomolekularnych toksyn pochodnych wydaje się być 2—3 krotnie

wyższa od toksyczności wysokocząsteczkowych progenitorów. Według Sakaguchi i Sakaguchi (47) w przypadku np. botuliny E moc toksyny pochodnej wynosiła $10,5 \times 10^7$ LD₅₀/mg N, a macierzystego progenitora $3,3 \times 10^7$ LD₅₀/mg N.

Komponenta neurotoksyczna w aktywowanych endogennie hodowlach proteolitycznych szczepów A, B i F występuje w tzw. formie pękniętej, lub naciętej („nicking”) tj. dwułańcuchowej (2, 9). Natomiast składnik ten u nieproteolitycznych szczepów typu B, C, D, E i F jest jednolańcuchowy i dopiero w następstwie aktywacji trypsyną przechodzi w postać dwułańcuchową (37). Jako podjednostki strukturalne w pękniętej neurotoksynie wyróżnia się tzw. łańcuchy ciężkie H („heavy”) oraz lekkie L („light”), które są powiązane mostkami dwusiarczkowymi S — S rodników cysteiny (8). Całkowite rozbitcie mostków dwusiarczkowych uzyskuje się przy zastosowaniu elektroforezy w żelu poliakrylamidowym z siarczanem dwuodcynowo-sodowym (SDS) w obecności specyficznego reduktora tych wiązań, a mianowicie ditiotretolu (DTT). Wspomnieć należy, że powyższy proces przebiega z utratą 99% toksyczności (57).

Ciężar molekularny łańcuchów H i L w poszczególnych typach neurotoksyn jest podobny i kolejno wynosi: w przypadku typu A 97 000 i 53 000 (8), B 104 000 i 59 000 (2), C 98 000 i 53 000 (59), D 110 000 i 60 000 (37), E 102 000 i 50 000 (8) oraz F 105 000 i 56 000 (64). Zdaniem DasGupty i Sugiyamy (8) oraz Syuto i Kubo (59) stanowi to pewien dowód za wspólną strukturą molekularną w różnych typach botulin.

Strukturalne podstawy aktywności toksyn botulinowych

Toksynę botulinową wyróżnia spośród innych jadów bakteryjnych niezwykła moc biologiczna oraz odporność na działanie pH i enzymów trawiennych przewodu pokarmowego. Dotychczasowe próby określenia podstaw strukturalnych dla tych właściwości nie dały jednoznacznych wyników. Boroff i DasGupta (4) wiązali fotooksydacyjną inaktywację jadu ze spadkiem w niej liczby cząsteczek tryptofanu i metioniny. Również Beers i Reich (2) podobną rolę w aktywności przypisywali aminokwasom hydrofobowym tj. tryptofanowi i izoleucynie. Natomiast Gerving i wsp. (20) wyrazili pogląd, że aktywne centrum neurotoksyn typów A, B i E zawiera cysteinę, a nie tryptofan. Powyższą opinię zdają się weryfikować ostatnie badania podnoszące rolę grup SH oraz mostków S — S pomiędzy rodnikami cysteiny (58). Knox i wsp. (31) przypisują działanie stabilizacyjne mostkowi S — S występującemu w cząsteczce toksyny, poza jej aktywnym centrum. Podobnie Sugiyama i wsp. (57) wiążą aktywność botuliny z integralnością przynajmniej 1 mostka S — S po-

między łańcuchem H i L w pękniętej komponente neurotoksycznej. Natomiast w przypadku jednołańcuchowej toksyny („intact toxin”) krytyczne wiązanie S — S ma posiadać lokalizację wewnątrzłańcuchową.

Początkowo łączono aktywację botuliny z przechodzeniem jej w formę cząsteczek pękniętych tzw. „nicking” (8). Później stwierdzono, że enzymatyczne nacięcie molekuly z reguły nie powoduje wzrostu jej toksyczności (37). Sprzężenie procesu enzymatycznej aktywacji z pojawieniem się toksyny w formie dwułańcuchowej obserwowano jedynie przy pH 6. Natomiast w pH 4,5 całkowite uczynienie jadu zawsze poprzedzało powstawanie pękniętych cząsteczek (43).

Ohishi i Sakaguchi (43) przy trypsynowaniu hodowli i proteolitycznego szczepu „Okra” stwierdzili 2 toksyczne frakcje o CM 112 000 i 57 000. Składnik 112 000 po dłuższym działaniu tego enzymu ulegał dalszej fragmentacji uzyskując przy tym maksymalną aktywność. Ponadto w warunkach słabo zasadowego pH pojawiał się 3 fragment o CM 142 000 daltonów. Może to wskazywać na obecność w cząsteczce 3 wiązań peptydowych o różnej wrażliwości na trypsynę.

Występowanie toksyny botulinowej jako wielkocząsteczkowego agregatu białka złożonego ze zróżnicowanych funkcjonalnie komponent pozwala na nowe i pełniejsze ujęcie jej enteralnej aktywności. Ostatnie badania autorów japońskich tj. Sakaguchi i Sakaguchi (47), Ohishi i wsp. (44) oraz Sugii i wsp. (54) dowiodły silniejszego działania przez przewód pokarmowy botulin 19 S i 16 S niż jadów 12 S i 7 S. Jak stwierdzono progenitor B — L (16 S) przewyższał o 7×10^2 toksyczność progenitora B — M (12 S) oraz o $1,6 \times 10^4$ aktywność toksyny pochodnej (7 S).

Ohishi i wsp. (44) wyrażają pogląd, że wyższe różnice zależą od specyficznej struktury nietoksycznych komponent związanych z neurotoksyną lub od właściwości obu tych składników. Jednocześnie wyższa aktywność progenitora B — L (16 S) niż krystalicznej botuliny A — L (19 S) może wskazywać na znaczenie w tym względzie jeszcze innych, dotychczas nie poznanych czynników.

Również wysokocząsteczkowe progenitory są bardziej odporne na destrukcyjne działanie enzymów trawiennych jelit i kwasu żołądka, niż niskocząsteczkowe toksyny pochodne. Sugii i wsp. (54) wykazali, że pochodna toksyna B (7 S) w środowisku soku żołądkowego szczura ulegała całkowitej detoksykacji już po 10 min., podczas gdy botulina B — M jeszcze po 80 min. zachowywała 10% wyjściowej aktywności. Natomiast w soku jelitowym szczurów cząsteczki jadu 7 S traciły toksyczność w ciągu 40 min., a molekuly 16 S przy 3 krotnie dłuższej ekspozycji były inaktywowane tylko w 40%.

Zdaniem Sugii i wsp. (54) znaczenie dla stabilności botuliny jako toksyny enteralnej posia-

da fakt, że progenitor, w przeciwieństwie do łańcuchowego rozpadu „*in vitro*”, — nie dysocjuje w soku jelitowym szczura w pH 7, co może stanowić mechanizm zabezpieczający neurotoksynę przed detoksykacją. Dlatego w dalszym ciągu pozostaje do wyjaśnienia mechanizm przenikania cząsteczek jadu z jelit do krwiobiegu. Pewne nowe możliwości dla poznania tego procesu mogą posiadać badania Schantza i Gaspera (50), wskazujące na aktywniejszą dyfuzję cięższych molekuł nitkowatych niż lżejszych sferycznych.

Rozważając zagadnienie pozycji taksonomicznej dla toksyn botulinowych wydaje się, że nie można ich klasyfikować w grupie tzw. syntoksyn według terminologii Bonventre i wsp. (3) tj. wysokocząsteczkowych jadów utworzonych z wielu identycznych składników łącznie warunkujących toksyczność takich kompleksów. Natomiast struktura molekularna botulin odpowiada budowie tzw. prostych toksyn („simple toxins”), przedstawiających agregaty złożone z różnych komponent, z których tylko 1 składnik neurotoksyczny decyduje o ich aktywności. W świetle dotychczasowej wiedzy można też sądzić, że w naturalnych warunkach rolę enteralnej toksyny mogą lepiej spełniać wielkocząsteczkowe i stabilne progenitory 12 S, 16 S i 19 S, niż wrażliwe na działanie soków trawiennych jelit niskocząsteczkowe toksyny pochodne 7 S.

Piśmiennictwo

1. Balding P., Gold E. R., Boroff A. D., Roberts T. A.: *Immunology* 25, 773, 1973.
2. Beers W. H., Reich E.: *J. biol. Chem.* 244, 4473, 1969.
3. Bonventre P. F., Lincoln R. E., Lamanna C.: *Bact. Rev.* 31, 95, 1967.
4. Boroff D. A., DasGupta B. R.: *J. biol. Chem.* 239, 3694, 1964.
5. Boroff D. A., Townsend R., Fleck U., DasGupta B. R.: *J. biol. Chem.* 241, 5165, 1966.
6. Ciccarelli A. S., Whaley D. N., McCroskey L. M., Gimenez D. F., Dowell V. R., Hatheway C. L.: *Appl. Environ. Microbiol.* 34, 843, 1977.
7. DasGupta B. R., Boroff D. A.: *J. biol. Chem.* 243, 1065, 1968.
8. DasGupta B. R., Sugiyama H.: *Biochem. biophys. Res. Commun.* 48, 108, 1972.
9. DasGupta B. R., Sugiyama H.: *Biochem. biophys. Res. Commun.* 48, 750, 1972.
10. DasGupta B. R., Sugiyama H.: *Can. J. Microbiol.* 17, 1357, 1971.
11. DasGupta B. R., Sugiyama H.: *Can. J. Microbiol.* 23, 1257, 1977.
12. DasGupta B. R., Sugiyama H.: *Infect. Immun.* 6, 587, 1972.
13. DasGupta B. R., Sugiyama H.: *Infect. Immun.* 14, 680, 1976.
14. Dolman C. E., Gervin J.: cyt. według poz. 36.
15. Eklund M. W., Poysky F. T.: *Appl. Microbiol.* 24, 108, 1972.
16. Eklund M. W., Poysky F. T.: *Appl. Microbiol.* 27, 251, 1974.
17. Eklund M. W., Poysky F. T., Reed S. M., Smith C. A.: *Science* 192, 480, 1971.
18. Eklund M. W., Poysky F. T., Wieler D. I.: *Appl. Microbiol.* 15, 1316, 1967.
19. Gerwing J., Dolman C. E., Arnott D. A.: *J. Bact.* 84, 302, 1962.
20. Gerwing J., Dolman C. E., Kason D. V., Tremaine J. H.: *J. Bact.* 91, 484, 1963.
21. Gerwing J., Dolman C. E., Ko A.: *J. Bact.* 89, 1176, 1965.
22. Gimenez D. F., Ciccarelli A. S.: *Zentbl. Bakt. ParasitKde I* 215, 212, 1970.
23. Gimenez D. F., Ciccarelli A. S.: *Zentbl. Bakt. ParasitKde I* 215, 221, 1970.
24. Hauschild A. H. W., Hilsheimer R.: *Can. J. Microbiol.* 14, 805, 1968.
25. Inoue K., Iida T.: *Jap. J. Microbiol.* 14, 87, 1970.
26. Inukai Y.: *Jap. J. vet. Sci.* 11, 87, 1963.
27. Jansen B. C.: *Onderstepoort J. vet. Res.* 38, 93, 1971.
28. Kegeles G.: *J. Am. Chem. Soc.* 68, 1670, 1946.
29. Kitamura M., Sakaguchi S., Sakaguchi G.: *Biochem. biophys. Acta* 168, 207, 1968.

30. Kitamura M., Sakaguchi S., Sakaguchi G.: J. Bact. 98, 1173, 1969.
31. Knorr J. N., Brown W. P., Spero L.: Biochem. biophys. Acta 214, 350, 1970.
32. Kozaki S., Sakaguchi G.: Infect. Immun. 11, 932, 1975.
33. Kozaki S., Sakaguchi S., Sakaguchi G.: Infect. Immun. 10, 750, 1974.
34. Kozaki S., Sugii S., Ohishi I., Sakaguchi S., Sakaguchi G.: Jap. J. med. Sci. Biol. 28, 70, 1975.
35. Lamanna C., Lowenthal J. P.: J. Bact. 61, 751, 1951.
36. Lamanna C., Sakaguchi G.: Bact. Rev. 32, 242, 1971.
37. Miyazaki S., Iwasaki M., Sakaguchi G.: Infect. Immun. 17, 395, 1977.
38. Nakane H., Iida H.: Appl. Environ. Microbiol. 34, 99, 1977.
39. Oguma K., Iida H., Shiozaki M.: Infect. Immun. 14, 597, 1976.
40. Oguma K., Iida H., Shiozaki M., Inoue K.: Jap. J. med. Sci. Biol. 28, 301, 1975.
41. Ohishi I., Sakaguchi G.: Appl. Microbiol. 28, 923, 1974.
42. Ohishi I., Sakaguchi G.: Appl. Microbiol. 29, 444, 1975.
43. Ohishi I., Sakaguchi G.: Infect. Immun. 17, 402, 1977.
44. Ohishi I., Sugii S., Sakaguchi G.: Infect. Immun. 16, 107, 1977.
45. Ross H. E., Warren M. E., Barnes J. M.: J. gen. Microbiol. 3, 148, 1949.
46. Sakaguchi G., Ohishi I., Kozaki S., Sakaguchi S., Kitamura M.: Jap. J. med. Sci. Biol. 27, 95, 1974.
47. Sakaguchi G., Sakaguchi S.: Jap. J. med. Sci. Biol. 27, 241, 1974.
48. Sakaguchi G., Sakaguchi S., Imai N.: J. Bact. 87, 401, 1964.
49. Sakaguchi G., Sakaguchi S., Kozaki S., Sugii S., Ohishi I.: Jap. J. med. Sci. Biol. 27, 161, 1974.
50. Schantz E. J., Gasper E.: Jap. J. med. Sci. Biol. 28, 66, 1975.
51. Schantz E. J., Spero L.: cyt. według poz. 56.
52. Shimizu T., Kondo H.: Jap. J. med. Sci. Biol. 26, 269, 1973.
53. Smith L. D., Holdeman L. V.: The Pathogenic Anaerobic Bacteria CH. C. Thomas, Springfield, USA 1968.
54. Sugii S., Ohishi I., Sakaguchi G.: Infect. Immun. 16, 910, 1977.
55. Sugii S., Sakaguchi G.: Infect. Immun. 12, 1262, 1975.
56. Sugii S., Sakaguchi G.: Jap. J. med. Sci. Biol. 28, 320, 1975.
57. Sugiyama H., DasGupta B. R., Yang K. Ch.: Proc. Soc. exp. Biol. Med. 143, 589, 1973.
58. Sugiyama H., Moberg L. J., Messer S. L.: Appl. Environ. Microbiol. 33, 963, 1977.
59. Syuto B., Kubo S.: Appl. Environ. Microbiol. 32, 400, 1977.
60. Turner A. W., Rodwill A. W.: Aust. J. exp. Biol. med. Sci. 21, 17, 1943.
61. Wagman J.: cyt. według poz. 50.
62. Wagman J., Bateman J. B.: Archs Biochem. Biophys. 45, 375, 1953.
63. Yang H., Sugiyama H.: Appl. Microbiol. 29, 592, 1975.
64. Yang H., Sugiyama H.: Appl. Microbiol. 29, 598, 1975.

Adres autora: doc. dr habil. Zygmunt Cygan, ul. Słowicza 2 m. 7, 20-336 Lublin.

MICHAŁ BARTOSZCZE, JACEK ROSZKOWSKI, STANISŁAW BRODZICKI
Puławy Kraków

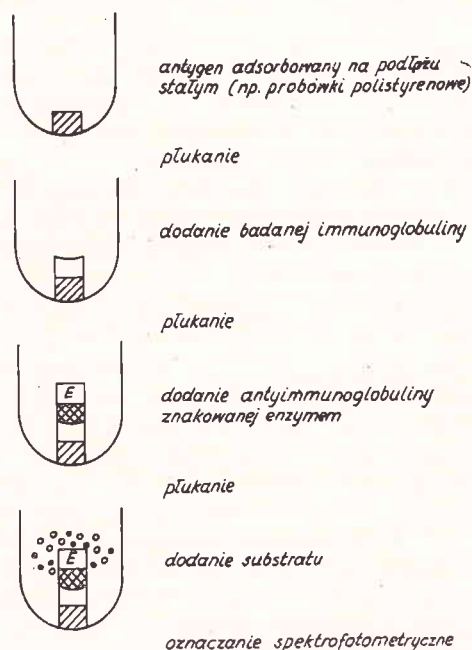
Zastosowanie immunoenzymatycznej metody ELISA w diagnostyce wirusologicznej

Zastosowanie w ostatnich latach enzymów do znakowania przeciwciał pozwoliło na wprowadzenie wysoce swoistych i czułych metod jakościowego wykrywania wirusów (2, 12). Metody te w coraz większym stopniu zaczynają zastępować stosowane do niedawna, ale obciążone szeregiem wad, immunofluorescencję i techniki radioimmunologiczne.

W 1971 r. Engvall i Perlmann (9, 10) oraz niezależnie Van Weemen i Schuurs (19) wprowadzili immunoenzymatyczną technikę, zwaną w skrócie ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay), pozwalającą na ilościowe oznaczanie przeciwciał i antygenów w materiale biologicznym. Technika ta oparta jest na zasadzie chromatografii powinowactwa, w której jeden z rozpuszczalnych składników (przeciwciało lub antygen) adsorbuje się trwale na stałym podłożu-nośniku. W dalszym etapie przyłącza się do niego obecny w badanym materiale antygen lub przeciwciało, a wytworzony kompleks łączy się z przeciwciałem znakowanym enzymem. Po dodaniu odpowiedniego dla enzymu substratu, oznacza się fotometrycznie stopień hydrolizy substratu przez enzym i na podstawie uzyskanych wyników wnioskuje się o zawartości przeciwciał lub antygeny w testowanym materiale.

Do najczęściej stosowanych w technice ELISA metod należą: pośrednia metoda znakowanych antyglobulin do oznaczania przeciwciał (ryc. 1) oraz tzw. metoda „podwojonych” przeciwciał do oznaczania antygeny (ryc. 2). W pierwszej z nich, do pokrytych antygenem nośników (np.

próbówek) dodaje się badaną surowicę, a po przepłukaniu — znakowaną enzymem antyglobulinę i odpowiedni substrat. Obecne w próbówce przeciwciała wiążą się z antygenem, a następnie z antyglobuliną znakowaną enzymem. W



Ryc. 1. Pośrednia metoda znakowanych antyglobulin do wykrywania przeciwciał