POPIS OBJEVU

K DIPLOMU ČÍS. 55

Přihlášeno: 07.02.84 (PO 12-84)

Právo přednosti od 21.09.83

Zveřejněno na 16.kongresu Čs.společnosti mikrobiologické při ČSAV, Sborník kongresu str.6, jako příspěvek O 15

Uděleno: 19 12 90

Vydáno:

MDT 576.8.093

Autoři objevu: Julák Jaroslav RNDr.CSc., Praha
Tureček František RNDr.CSc., Praha

Název objevu: Závislost účinnosti vakciny Propionibacterium acnes na složení celulárních mastných kyselin

Předmět objevu:

1. Jev spočívající v přítomnosti mastných kyselin linolové, tuberkulostearové a 10-ketooktadekanové a rozvětvených mastných alkoholů C_{15} a C_{17} v lipidech vakciny připravené z Propionibacterium acnes kmen Hudáč 26/78 (CNCTC AO 19/83).

2. Zákonitost spočívající v lineární závislosti biologické účinnosti této vakciny uvedené v bodě 1, měřené testem splenomegalie, na poměrném zastoupení strukturních typů celulárních mastných kyselin v jejích lipidech.

Abstrakt

ČS 0 3 6 1 6 4
DOŠLO 05 VII 86
ÚŘAD PRO VYNÁLEZY A OBJEVY

Propionibacterium acnes, známé též pod starším názvem Corynebacterium parvum nebo acnes, je grampozitivní, anaerobní, nesporulující bakterie. Podle doposud známých údajů jsou mezi celulárními mastnými kyselinami tohoto mikroba zastoupeny převážně rozvětvené kyseliny s 15 a 17 atomy uhlíku /Moss C. W., Dowell V. R., Lewis V. J., Schekter M. A., J.Bacteriol., 94, 1300-1305, /1967//, dominantní složkou je isopentadekanová /13-methyltetradekanová, iso 15/ kyselina /Moss C. W., Cherry W. B., J. Bacteriol., 95, 241-242, /1968//. Její relativní zastoupení kolísá u různých kmenů v rozmezí větším než 20 %. Kromě biochemických znaků a složení produktů fermentace přispěly údaje o složení celulárních mastných kyselin k reklasifikaci tohoto mikroba do rodu Propionibacterium /Moss C. W., Dowell V. R., Farshtchi D., Raines L. J., Cherry W. B., J. Bacteriol., 97, 561-570, /1969//.

Medicinský význam tohoto mikroba spočívá mj. v tom, že z některých jeho kmenů jsou připravovány vakciny používané v imunologickém výzkumu i v klinické praxi /Pulverer G., Deut. Med. Wochenschr., 107, 1491-1492, /1982/, [redacted]
Tyto vakciny jsou díky svým imunomodulačním vlastnostem schopny stimulovat retikuloendothelový systém /Halpern B. N., Prevot A. R., Biozzi G., Stiffel C., Mouton D., Morard J. C., Bouthillier Y., Decreusefond C., J. Reticuloendothel. Soc., 1, 77-96, /1964//, inhibovat růst tumorů a tvorbu metastáz /Halpern B. N., Biozzi C., Stiffel C., Mouton D., Nature, 212, 853-854, /1966//, zvyšovat odolnost proti bakteriálním /Calhoun K., Trachtenberg L., Hart K., Surgery, 87, 52-58, /1980// a virovým infekcím /Gangemi J. D., Hightower J. A., Jackson R. A., Maher

M. H., Welsh M. G., Sigel M. M., Infect. Immun., 39, 726-735, /1983//. Některé z těchto efektů zůstávají alespoň částečně zachovány u různých složek celé vakciny /Tuttle R. L., Cantrell J., in: Augmenting Agents in Cancer Therapy, E. M. Hersh /ed./, Raven Press, New York 1981, pp. 53-69/. Biologická účinnost vakcin se běžně stanovuje testem splenomegalie myší /Adlam C., Scott M. T., J. Med. Microbiol., 6, 261-274, /1973//, jehož výsledky jsou v korelaci s dalšími biologickými efekty. Účinnost vakcin kolísá v závislosti na způsobu jejich přípravy a na použitém kmeni /Ko H. L., Roszkowski W., Jeljaszewicz J., Pulverer G., Med. Microbiol. Immunol., 170, 1-9, /1981//. Vakciny pro humánní použití jsou dostupné i komerčně /firmy Welcome, Anglie; bioMérieux, Francie/. Vypracování optimálního způsobu přípravy vakciny se standardní vysokou účinností, objasnění mechanizmů jejího působení, odstranění nežádoucích vedlejších účinků a hledání dalších možností therapeutického využití jsou předmětem výzkumu.

Předmětem objevu je stanovení jevu, spočívajícího v tom, že kromě známých složek, tj. mastných kyselin typu n-, nenasycených monoenických a rozvětvených typu iso a anteiso, obsahují lipidy vakciny připravené z Propionibacterium acnes linolovou /18:2/, tuberkulostearovou /10-methyloktadekanovou, 19TB/ a 10-ketostearovou /10-ketooktadekanovou, 10-O-18/ kyselinu a rozvětvené mastné alkoholy C_{15} a C_{17}, br 15ol a br 17ol. / OZNAČOVANÉ

Důkaz tohoto jevu byl proveden stanovením přítomnosti těchto složek v lipidech produkčního kmene Propionibacterium acnes Hudáč 26/78, deponovaného v Čs. státní sbírce typových kultur, Institut hygieny a epidemiologie, Šrobárova 48 Praha 10, pod číslem AO 19/83 a používaného k přípravě vakciny. Bylo použito různých šarží vakciny, kultivované ve všech případech při 37 °C ve VL-bujónu šarže č. 3040288 /Imuna, Šarišské Michalany/. U šarží kultivovaných staticky byla anaerobióza zajištěna povařením média 15 minut a pokrytím tekutým parafinem. Ostatní šarže vakciny byly kultivovány ve fermentoru s mícháním 180 l min^{-1}, anaerobióza probublávání 1 l min^{-1} žárovkérenského dusíku bez úpravy, nebo čištěného od stop kyslíku alkalickým roztokem

anthrachinon-β-sulfonanu sodného a kyselým roztokem chromnaté soli.

Vakcina byla z biomasy připravována standardním způsobem, to je zahřátím na 60 °C 1 hodinu, centrifugací při 1300 g, promytím vodou a lyofilizací. Biologická účinnost preparátů byla stanovována testem splenomegalie a hepatomegalie myší. Skupiny 10 myší 17-20 g byly usmrceny 11 dní po i.v. aplikaci 1 mg vakciny v 0,5 ml fyziologického roztoku. Slezinný resp. jaterní index byl vypočten podle vztahu

$$i = \frac{\overline{i_{exp}}}{\overline{i_{kont}}}$$

kde $\overline{i_{exp}}$ je průměrný poměr váhy slezin resp. jater ku váze myší v experimentální a $\overline{i_{kont}}$ v kontrolní skupině, které byl podán pouze fyziologický roztok.

Lipidové extrakty byly z vakciny získávány: a/ třídenní extrakcí směsí chloroform-methanol 2:1 za studena; b/ třídenní extrakcí vroucím ethanolem v Soxhletově přístroji a purifikací surového preparátu další extrakcí chloroform-methanolem; c/ pětinásobnou desetiminutovou extrakcí petroletherem /b. v. 30 až 50 °C/ za studena. Po odpaření rozpouštědel byly získané lipidy transesterifikovány na methylestery mastných kyselin methoxidem sodným v methanolu a chlorovodík v methanolu. Používaná rozpouštědla čistoty p. a. byla destilována ve skle a jejich čistota chromatograficky kontrolována.

Plynové chromatografie methylesterů byla prováděna na přístroji vybaveném plamenově ionizačním detektorem, elektronickou regulací průtoku plynu a elektronickým integrátorem. Bylo použito náplňové kolony 1,5 m x 3 mm se 3 % dimethylpolysiloxanu, pracující při teplotě 170 °C 45 minut a 5 °C min^{-1} do 250 °C s průtokem dusíku 12,5 ml min^{-1}, a náplňové kolony 3,5 m x 3 mm s 10 % ethylenglykoladipátu, pracující při 180 °C a průtoku dusíku 20 ml min^{-1}. Složky byly identifikovány porovnáním relativních retencí se standardy a pomocí hmotnostních spekter. Plynová chromatografie s hmotnostní spektrometrií byla prováděž-

na po dělení na náplňové koloně s 3,5 % dimethylpolysiloxanu, pracující při 180 °C 13 minut a 5 °C min^{-1} do 220 °C při vstupním tlaku hélia 0,8 kp cm^{-2} a po oddělení nosného plynu dvoustupňovým separátorem typu Becker-Ryhage, při ionizační energii 75 eV.

Na obr. 1 je uveden typický chromatogram vakciny s malou biologickou účinností /slezinný index i = 4,84/. Byl získán výše uvedenou metodikou na koloně s dimethylpolysiloxanem, složky jsou označeny symbolicky podle vzoru počet atomů uhlíku : počet dvojných vazeb /např. 16:0 je hexadekanová neboli palmitová kyselina/. Na obr. 2 je typický chromatogram vakciny s velkou účinností /i = 8,22/.

Přítomnost ketoskupiny v poloze 10 v kyselině 10-ketooktadekanové /10-0-18/ byla prokázána ztrátou heptenu z molekulového iontu McLaffertyho přesmykem /m/z 214/ a přítomností komplementárního iontu $C_{10}H_{20}O^+$ /m/z 156/ v jejím hmotnostním spektru. Možnost vzniku 10-ketooktadekanové kyseliny arteficiální oxidací byla vyloučena zpracováním standardních směsí nenasycených mastných kyselin a jejich methylesterů stejným způsobem jako bakteriální materiál, jakož i přítomností jen jednoho polohového isomeru. Možnost záměny s 9,10-epoxystearovou kyselinou, která je známým kontaminantem lipofilních materiálů /Ulsaker G. A., Teien G., Analyst, 108, 521-524, /1983// a která má podobné chromatografické vlastnosti, byla vyloučena porovnáním s hmotnostním spektrem standardu připraveného epoxidací methyloleátu chlorperoxybenzoovou kyselinou a dávkovaného přímo do iontového zdroje. Hmotnostní spektra obou těchto látek jsou porovnéna na obr. 3. Zastoupení 10-ketooktadekanové kyseliny v lipidech vakcin je nejvíce 9,7 %.

Linolová kyselina, která je běžnou složkou vyšších organismů, se u bakterií vyskytuje jen vzácně /Fulco A., Progr. Lipid Res., 22, 133-160, /1983//. V lipidech Propionibacterium acnes se její relativní zastoupení pohybuje podle způsobu přípravy vakciny a podle způsobu extrakce v rozmezí 0,2 až 5,5 %.

Tuberkulostearová kyselina byla doposud považována za charakteristickou složku příslušníků řádu Actinomycetales /Larsson L., Mårdh P.-A., Odham G., Westerdahl G., Chromatogr., 182, 402-408, 1980//. V lipidech vakciny Propionibacterium acnes nepřevyšuje její zastoupení 1,2 %.

Stejně jako v případě 10-ketooktadekanové kyseliny nebyla doposud u bakterií popsána přítomnost rozvětvených mastných alkoholů C_{15} a C_{17}. Typ větvení řetězce se z hmotnostních spekter nepodařilo jednoznačně určit, stejně jako nebyla jednoznačně potvrzena identita složek vyšších než C_{20}. Sumární zastoupení obou alkoholů nepřevyšuje 7,8 %, přičemž preparáty vakciny obsahující alkoholy neobsahují 10-ketooktadekanovou kyselinu vůbec nebo jen méně než 0,2 %.

V tzv. pevně vázaných lipidech, uvolněných kyselou hydrolýzou z vakciny delipidované předem organickými rozpouštědly, se kromě stopových množství linolové kyseliny nevyskytují ani tuberkulostearová a 10-ketooktadekanová kyselina, ani rozvětvené mastné alkoholy.

Předmětem objevu je dále zákonitost, spočívající v závislosti biologické účinnosti vakciny připravené z Propionibacterium acnes na poměrném zastoupení strukturních typů celulárních mastných kyselin v jejích lipidech. Tuto závislost je možno vystihnout vztahem

$$i = 0{,}66 \cdot p + 2{,}24.$$

Definice slezinného indexu i je uvedena výše, poměr p je definován vztahem

$$p = \frac{\%\ /\text{iso} + \text{anteiso}/}{\%\ \text{n-}}$$

kde % /iso + anteiso/ je sumární relativní zastoupení rozvětvených a % n- relativní zastoupení n- kyselin. Koeficienty 0,66 a 2,24 byly stanoveny se směrodatnými odchylkami 0,16 resp. 0,84. Přes rozptyl hodnot slezinného indexu i zůstává stoupající trend této závislosti spolehlivě zachován jak při pravděpodobnosti 0,95, tak i 0,99. Grafické znázornění této závislosti je uvedeno na obr. 4, kde experimentální body odpovídají jednot-

livým šaržím vakciny, svislé úsečky udávají směrodatné odchylky slezinného indexu i, plná přímka je lineární regrese zjištěných hodnot a tečkované křivky vymezují obory spolehlivosti pro $\alpha = 0,05$ resp. $\alpha = 0,01$.

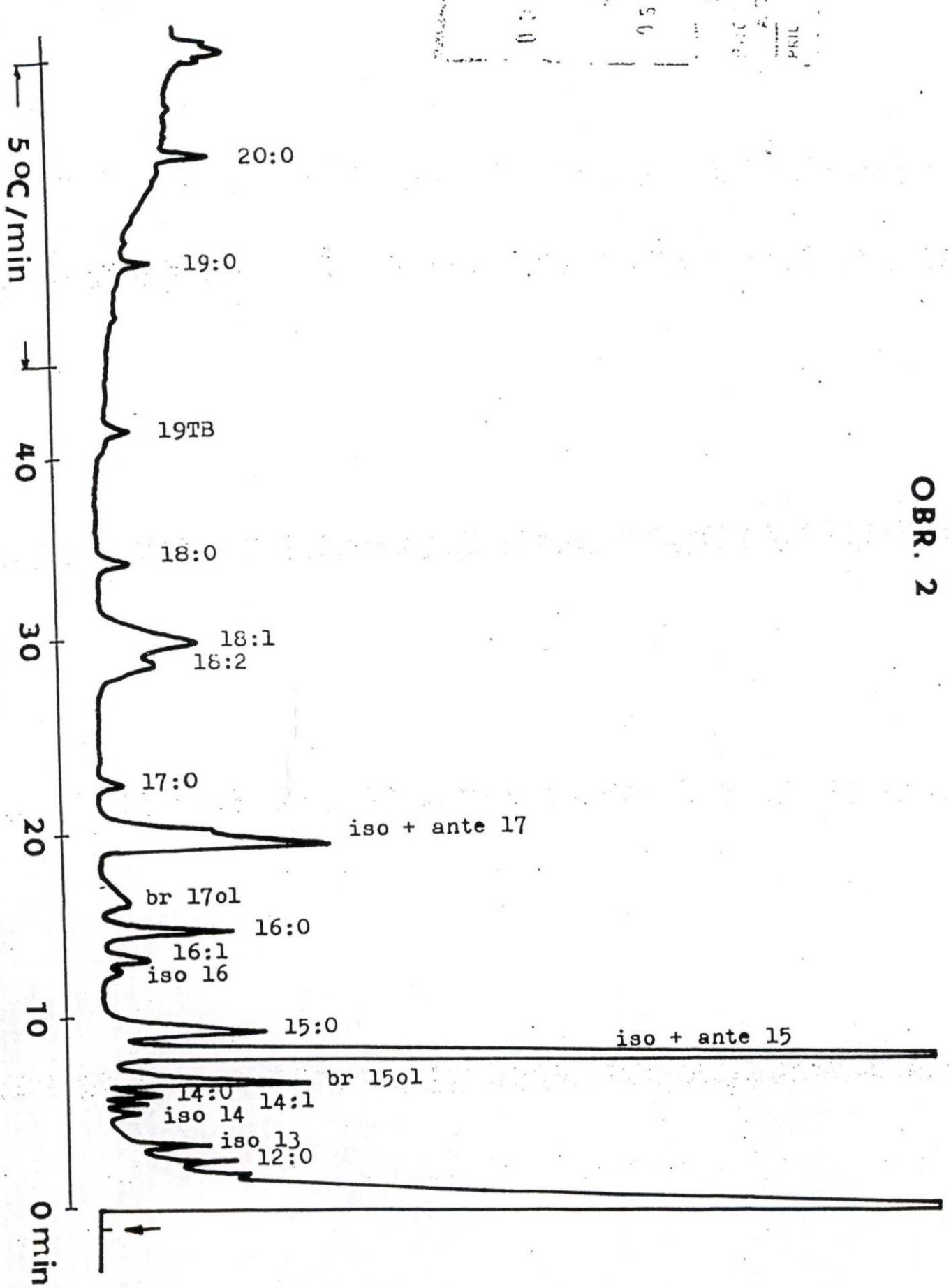
Příčiny rozdílné biologické účinnosti a rozdílů ve složení mastných kyselin různých šarží vakciny kultivované za stejných podmínek nebyly dosud objasněny. Záměna statického a míchaného způsobu kultivace nemá jednoznačný vliv na biologický účinek vakciny, ani na složení jejích mastných kyselin; při statickém způsobu kultivace dochází jen k mírnému zvýšení relativního zastoupení nenasycených kyselin. Vlastnosti vakciny jsou však výrazně ovlivňovány růstovou fází kultury z níž byla vakcina připravena: s dobou kultivace dochází k výraznému vzestupu biologické účinnosti s maximem v oblasti stacionární fáze resp. začátku fáze hynutí. Na obr. 5 jsou uvedeny závislosti pH kultury /křivka 1./, její optické hustoty /křivka 2/, slezinného /šrafované sloupce/ a jaterního indexu i /prázdné sloupce/ na době kultivace. Svislé úsečky udávají směrodatné odchylky indexu i, interval označený inoc. odpovídá růstu inokula před vlastní kultivací. Souhlasný průběh s extrémy při stejné době kultivace mají i změny v změny v zastoupení strukturních typů mastných kyselin. Průběh těchto změn je pro lipidy extrahované ethanolem uveden na obr. 6; analogické změny byly pozorovány i v extraktech chloroform-methanolových a petroletherových. Křivka 1 na tomto obrázku odpovídá změnám v zastoupení rozvětvených, křivka 2 n- a křivka 3 nenasycených kyselin. 10-ketooktadekanová kyselina /bod 4/ se vyskytuje jen v málo účinné vakcině z časné fáze růstu, jakož i ve vakcinách pěstovaných za použití dusíku nečištěného od stop kyslíku. Rozvětvené mastné alkoholy C_{15} a C_{17} jsou obsaženy jen ve vakcinách s vysokou účinností z pozdních fází růstu /křivka 5/.

Přestože jsou známy některé biologické účinky lipidových extraktů z Propionibacterium acnes, není možno považovat zjištěnou souvislost biologického účinku tohoto mikroba se složením jeho mastných kyselin za příčinnou. Složení mastných kyselin je třeba považovat za parametr indikující nepřímo celkový stav

vakciny. Zjištěná souvislost tohoto parametru s biologickou účinností dává předpoklad praktického použití při kontrole kvality vakciny metodami chemické analýzy.

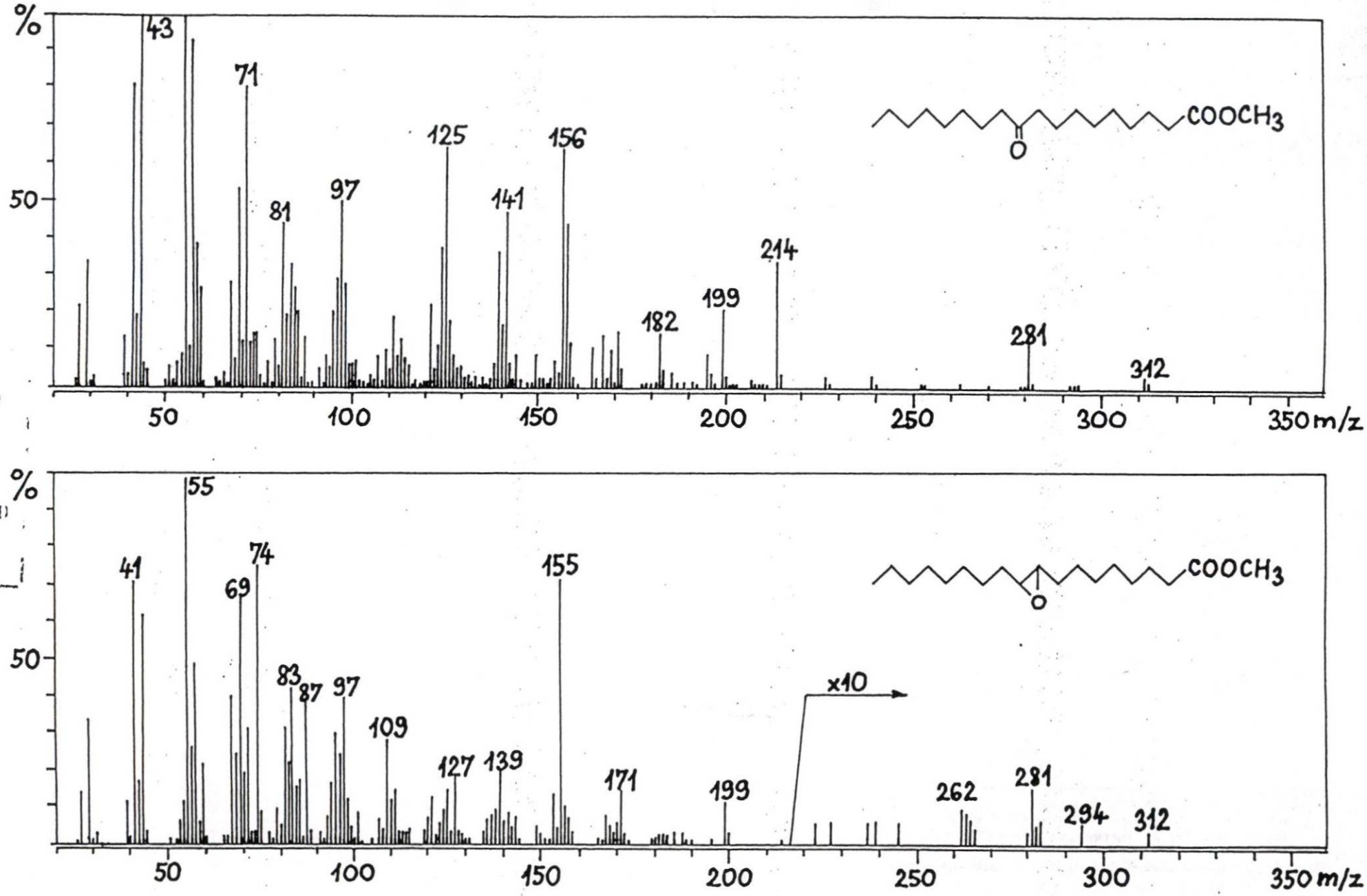
Ústav fotochemie a chemických látek ČSAV
oddělení chromatografie
128 03 Praha 2 Hlavova 3

OBR. 1

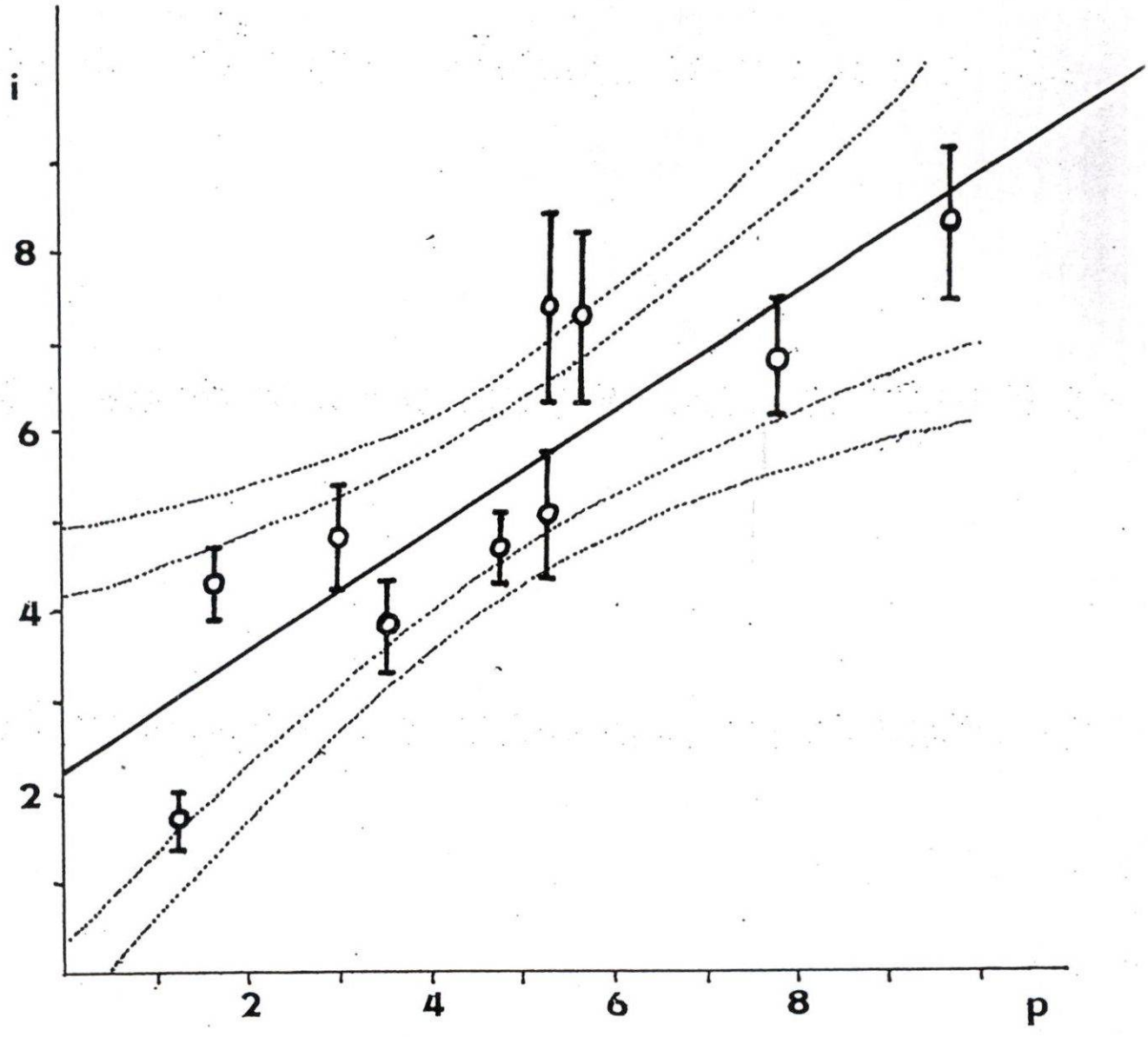

5 °C/min
40
30
20
10
0 min
20:0
19:0
19TB
18:0
18:1
16:2
17:0
iso + ante 17
br 17ol
16:0
16:1
iso 16
15:0
iso + ante 15
br 15ol
14:0
14:1
iso 14
iso 13
12:0

OBR. 2

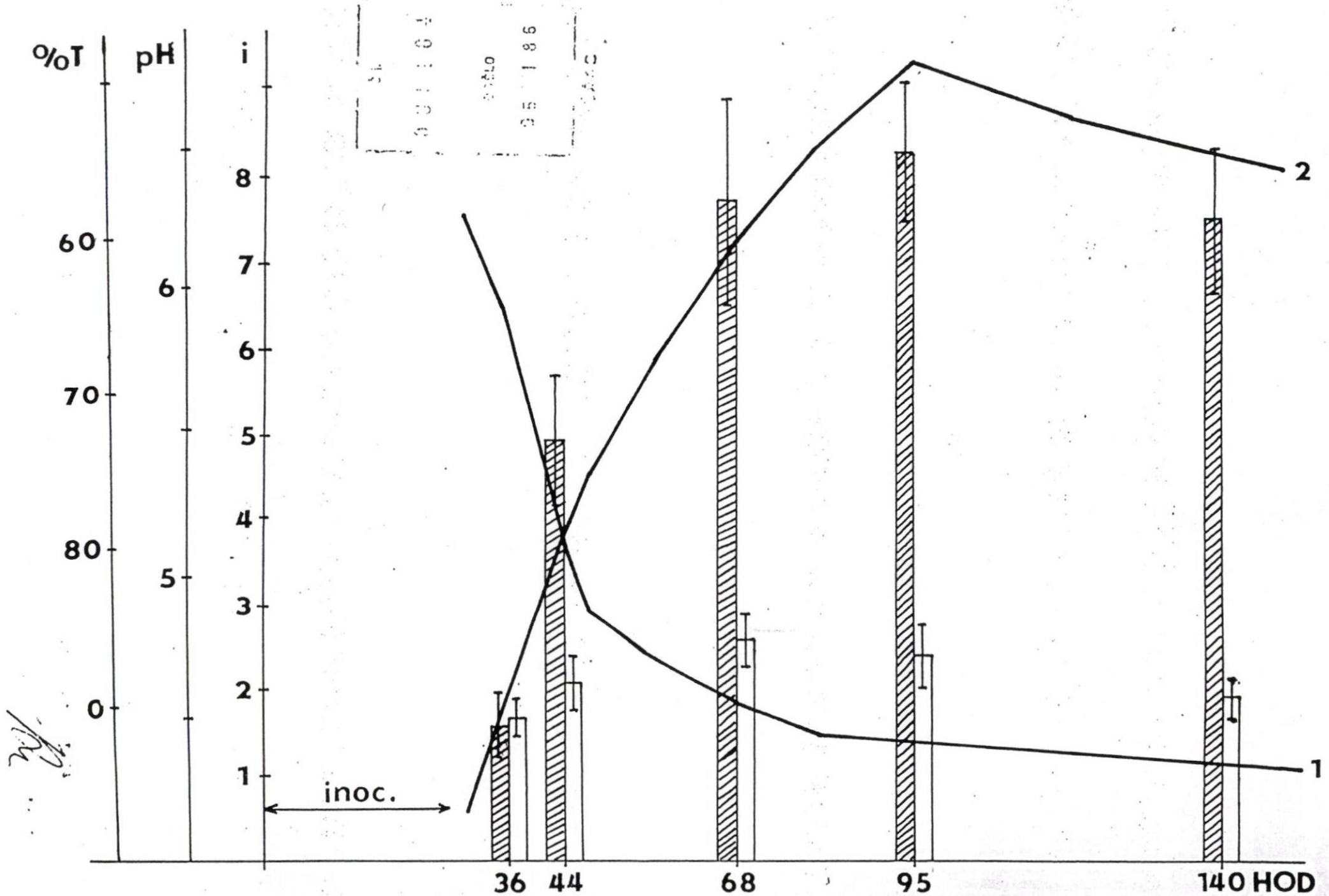
OBR. 3


%
43
71
125
156
97
81
141
214
199
182
281
312
50
100
150
200
250
300
350 m/z
COOCH3
O
%
55
41
74
69
155
83
87
97
109
127
139
171
199
262
281
294
312
x10
50
100
150
200
250
300
350 m/z
COOCH3
O

OBR. 4



OBR. 5



OBR. 6

