

Ермолаев А. В., Ершов А. Е., Сорокина Т. С., Подопригора И. В.

ГАСТОН РАМОН И КРАТКАЯ ИСТОРИЯ АНАТОКСИНОВ (К 100-ЛЕТИЮ ОТКРЫТИЯ)

ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы» Минобрнауки России, 117198, г. Москва

Авторы анализируют предысторию, основные вехи создания, исследований и совершенствования анатоксинов от работ Гастона Рамона, который 100 лет назад первым предложил метод получения надежного вакцинного препарата (анатоксина) на основе обезвреженного формалином дифтерийного (а затем и столбнячного) токсина (1922—1923), до научных достижений наших дней в области профилактики и лечения этих инфекционных заболеваний.

Ключевые слова: история микробиологии и вакцинологии; Гастон Рамон; анатоксины; дифтерия; столбняк.

Для цитирования: Ермолаев А. В., Ершов А. Е., Сорокина Т. С., Подопригора И. В. Гастон Рамон и краткая история анатоксинов (к 100-летию открытия). Проблемы социальной гигиены, здравоохранения и истории медицины. 2024;32(1):111—116. DOI: <http://dx.doi.org/10.32687/0869-866X-2024-32-1-111-116>

Для корреспонденции: Сорокина Татьяна Сергеевна, д-р мед. наук, профессор кафедры истории медицины Российского университета дружбы народов Минобрнауки России, e-mail: sorokina-ts@rudn.ru

Ermolayev A. V., Ershov A. E., Sorokina T. S., Podoprighora I. V.

GASTON RAMON AND CONCISE HISTORY OF ANATOXINS (TO THE CENTENARY OF DISCOVERY)

The Federal State Autonomous Educational Institution of Higher Education “The Patrice Lumumba Peoples’ Friendship University” of Russia of Minobrnauka of Russia (RUDN University), 117198, Moscow, Russia

The article analyzes past history, main milestones of making, research and improvement of anatoxins from works of Gaston Ramon who first proposed 100 years ago method of obtaining reliable vaccine preparation (anatoxin) on the basis of formalin neutralized diphtheria (and then tetanus) toxin (1922—1923) to nowadays scientific achievements in prevention and treatment of these infectious diseases.

Keywords: history of microbiology and vaccinology; Gaston Ramon; anatoxins; diphtheria; tetanus.

For citation: Ermolayev A. V., Ershov A. E., Sorokina T. S., Podoprighora I. V. Gaston Ramon and concise history of anatoxins (to the centenary of discovery). *Problemi socialnoi gigieni, zdravookhranenia i istorii meditsini*. 2024;32(1):111—116 (In Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.32687/0869-866X-2024-32-1-111-116>

For correspondence: Sorokina T. S., doctor of medical sciences, professor of the Chair of History of Medicine of the Federal State Autonomous Educational Institution of Higher Education “The Patrice Lumumba Peoples’ Friendship University” of Minobrnauka of Russia (RUDN University). e-mail: sorokina-ts@rudn.ru

Conflict of interests. The authors declare absence of conflict of interests.

Acknowledgment. The study had no sponsor support.

Received 05.04.2023

Accepted 02.11.2023

Предыстория анатоксинов началась задолго до описываемых открытий и неразрывно связана с исследованием патогенеза дифтерии (заболевания, известного с древнейших времен) и попытками разработать надежные способы ее лечения и профилактики. Безуспешные попытки спасения умирающих от этой болезни детей неоднократно описаны в научных статьях, в художественных произведениях классиков [1].

Май 1807 г. Любимый племянник французского императора Наполеона Бонапарта, сын Гортензии Богарне, объявленный наследником престола, умирает в Гааге от болезни, называвшейся тогда «пленочным крупом». Император подписывает декрет о назначении премии в 12 тыс. франков за открытие способов лечения и профилактики этого заболевания. Участие в конкурсе десятков европейских светил медицины не привело к значимым результатам. По заключению жюри, «они не представили ничего особенного, и их методы не могли стать поворотным пунктом и предметом восхищения в веках». Единственным «важным» итогом дискуссий было то, что в 1826 г. Пьер Фидель Бретонно (Pierre-Fidèle

Bretonneau, 1778—1862), составивший классическое описание этой болезни, впервые дал ей название — *дифтерит* (от греч. *diphthera* — пленка, кожа), а его ученик Арман Труссо (Armand Trousseau, 1801—1867) переименовал дифтерит в общепринятое сегодня название — *дифтерия* [2, с. 71; 3, с. 5].

**Открытие токсинов и формирование
антитоксического иммунитета с помощью
анатоксинов**

Согласно современным представлениям, инфекционные болезни — это сложный процесс взаимодействия хозяина и паразита. В ряде опытов на животных можно экспериментально воспроизвести основные симптомы заболевания не введением суспензии бактерий, а одними лишь фильтратами питательной среды, на которых выращивалась данная культура (не все животные чувствительны к дифтерии, и инъекции фильтратов — единственный надежный вариант опытов). Еще в 1887 г. Луи Пастер (Louis Pasteur, 1822—1895) экспериментально показал, что с помощью растворимых веществ, образующихся в питательном бульоне в результате жизнедея-

тельности микробов куриной холеры, удается получить у подопытных птиц практически все клинические проявления заболевания, возникающие при заражении этим возбудителем.

Год спустя, в 1888 г., Эмиль Ру (Emil Roux, 1853—1933)²⁵ и Александр Йерсен (Alexandre Yersin, 1863—1943), работавшие в Институте Пастера (фр. Institut Pasteur, Париж), в аналогичных экспериментах обнаружили, что симптомы дифтерии проявляются у морских свинок при парентеральном введении им фильтратов культур некоторых штаммов возбудителя дифтерии (*Corynebacterium diphtheriae*): ни при каких других способах введения фильтратов животным симптомы дифтерии не возникают. Таким образом, они показали, что интоксикация при заражении животных дифтерийной палочкой связана не столько с микробом, сколько с ядом — *токсином*, выделяемым возбудителем во внешнюю среду [4, с. 9].

В 1892 г. русский микробиолог Николай Федорович Гамалея (1859—1949) в работе «О действии растворимых ферментов на дифтерийный яд» заключил, что культуральные фильтраты холерного и дифтерийного микробов содержат именно белковые яды, поскольку они разрушаются пепсином и трипсином. Это наблюдение явилось очень важным этапом в разработке методов инактивации токсинов [5]. Последующие изыскания показали, что с помощью безмикробных культуральных фильтратов в модельных опытах у лабораторных животных могут быть вызваны специфические клинические проявления столбняка, ботулинических параличей, холерной диареи, скарлатинозной эритемы, сибиреязвенной эдемы и другие. Стало ясно, что развитие ряда патологических процессов при многих инфекционных заболеваниях вызвано продуктами жизнедеятельности микробов, ядовитыми для макроорганизма и получившими в связи с этим название «*микробные токсины*».

Однако не только сотрудники Института Пастера, но и микробиологи, представлявшие немецкую и другие научные школы микробиологии, внесли огромный вклад в исследование дифтерии и столбняка.

В 1883 г. немецкий бактериолог и патолог Эдвин Клебс (Edwin Klebs, 1834—1913) впервые описал, а ассистент Р. Коха — Фридрих Лёффлер (Friedrich Löffler, 1852—1915)²⁶ в 1884 г. выделил из зева больного и культивировал возбудитель дифтерии — дифтерийную палочку (*Corynebacterium diphtheriae*). При этом он не обнаружил способности микроба проникать во внутреннюю среду организма и поэто-

му заключил, что патогенез болезни связан с секрецией какого-то токсического фактора.

Практически параллельно с возбудителем дифтерии был открыт возбудитель столбняка (*Clostridium tetani*), сначала в 1883 г. русским хирургом Нестором Дмитриевичем Монастырским (1847—1888) и почти одновременно с ним, в 1884 г., — немецким терапевтом Артуром Николайером (Arthur Nicolaier, 1861—1942). Чистую культуру этого микроорганизма выделил в 1887 г. японский микробиолог Сибасабуро Китазато (Shibasaburo Kitasato, 1856—1931)²⁷, работавший в то время в Берлине в Институте Коха в качестве ассистента Эмиля фон Беринга (Emil Adolf von Behring, 1854—1917). В 1890 г. совместно с Берингом Китазато получил столбнячный токсин, предложил метод количественной оценки этого токсина и создал первую противостолбнячную сыворотку.

Открытие токсинов принципиально изменило взгляд на этиологию многих инфекционных болезней. В 1894 г. Эмиль Беринг писал, что «учение о бактериальных токсинах составляет одну из наиболее основательных глав в общей патологии». Именно с его легкой руки в 1890 г. в медицину вошло понятие «*противодифтерийная сыворотка*», что открыло новый, универсальный путь лечения многих инфекционных, а впоследствии и неинфекционных заболеваний. За свои открытия Эмиль фон Беринг в 1901 г. был удостоен первой в истории Нобелевской премии по физиологии и медицине «за работы по серотерапии, и прежде всего за ее использование в борьбе против дифтерии, которыми он открыл новое направление в области медицинских знаний и тем самым дал в руки врача победоносное оружие против болезни и смерти» [6, с. 29].

Одновременно с этим мысль об использовании токсинов (в качестве вакцин) для получения иммунитета к инфекционным болезням появилась у многих исследователей. Логика рассуждений была проста: если токсины вызывают основные симптомы заболевания, то, следовательно, «ослабленный» токсин сможет обеспечить стерильную форму болезни и последующий иммунитет к ней. Направление поиска было задано еще Паулем Эрлихом (Paul Ehrlich, 1854—1915), который в 1898 г. установил, что минимальная летальная доза (*dosa letalis minima*, DLM) у токсичного фильтрата дифтерийной палочки при хранении снижается [7]. Более стабильным оказалось свойство этого фильтрата связывать антитоксин, т. е. даже при снижении токсичности *антигенность*²⁸ сохраняется. Однако многие исследователи отмечали, что растворы токсинов обладали способностью самопроизвольно ослаблять свою «ядови-

²⁵Эмиль Ру — бактериолог, вице-директор Института Пастера (1895), позднее — генеральный директор Института Пастера (1904), член Парижской академии наук (1899), член Королевской шведской академии наук (1900), иностранный член Лондонского королевского общества (1913), иностранный почетный член Российской академии наук (1925).

²⁶Фридрих Лёффлер — немецкий бактериолог и гигиенист, один из основоположников медицинской микробиологии.

²⁷Сибасабуро Китазато — врач и бактериолог, член Японской академии наук, иностранный член Лондонского королевского общества, первый президент Медицинской ассоциации Японии. Чистую культуру микроорганизма выделил в 1887 г., в 1890 г. получил столбнячный токсин.

²⁸Антигенность — потенциальная способность антигена активировать компоненты иммунной системы и специфически взаимодействовать с факторами иммунитета.

История медицины

тость», что затрудняло работу с ними в экспериментах на животных.

Описываемым нами событиям, происходившим в бактериологии в конце XIX в., суждено было сыграть благоприятную роль в научной биографии Гастона Рамона (Gaston Léon Ramon, 1886—1963) — французского иммунолога, тогда еще выпускника Ветеринарной школы, молодого ученого, принятого в 1910 г. в возрасте 25 лет в Филиал Института Пастера в Гарше (близ Парижа) в качестве научного сотрудника. Впоследствии он станет руководителем этого Филиала, а в 1934—1940 гг. — заместителем директора, затем директором и почетным директором (с 1941 г.) Института Пастера в Париже; он будет избран членом Академии наук Франции, ряда национальных академий медицины, хирургии и ветеринарии, а с 1933 г. — почетным членом Всесоюзного института экспериментальной медицины (ВИЭМ) СССР.

Здесь необходимо отметить, что на заре своей научной деятельности Гастон Рамон был учеником Эмиля Ру (см. выше), который совместно с Ф. Лёффлером (первым в 1884 г. выделившим чистую культуру возбудителя дифтерии и научившимся культивировать ее на питательных средах) показал, как действуют палочки дифтерии, и доказал, что всеобщие проявления дифтерии — упадок сердечной деятельности, параличи и другие смертельные последствия — вызваны не самой бактерией, а вырабатываемым ею ядовитым веществом (токсином) и что это вещество, введенное в организм, само по себе вызывает те же симптомы при полном отсутствии дифтерийных микробов.

Одной из первых научных работ Гастона Рамона стало исследование феномена *флокуляции* — специфической серологической реакции между дифтерийным токсином, выделенным из токсинсодержащего фильтрата дифтерийной палочки, и антителами в антидифтерийной сыворотке. Реакция флокуляции позволяла титровать *in vitro* дифтерийный и столбнячный токсины, а затем и анатоксины. Таким образом, изучение феномена флокуляции сыграло важную роль в оценке количественных характеристик активности токсина и анатоксина, необходимости при определении вакцинной дозы.

И сегодня активность анатоксинов в вакцинном препарате оценивается в единицах LF (Limit Flocculation — лимит флокуляции), а удельную активность оценивают в LF/мг белкового азота. Максимальная возможная удельная активность, которой удалось достичь в наши дни, — 3000 LF/мг белкового азота, хотя, согласно современным критериям Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ), для оценки активности дифтерийного анатоксина в составе вакцины она должна быть не менее 1000, а столбнячно — не менее 1500 LF/мг белкового азота.

В процессе изучения антигенных и молекулярных свойств дифтерийного токсина совершенно очевидно возникал вопрос, каким образом можно ослабить токсичность этого яда при сохранении его *иммуногенности*²⁹ и антигенных свойств. Как уже

говорилось выше, Н. Ф. Гамалея отмечал, что обработка токсина ферментами (пепсином и трипсином) приводит к потере его токсичности. Ряд других исследователей применяли для детоксикации химические вещества, в частности детергенты, и отмечали при этом фрагментацию токсина и потерю его иммуногенности. Свойства формалина как антисептика к тому времени были хорошо известны, и он широко применялся для консервации разных биологических препаратов, включая сыворотки. По рекомендации Эмиля Ру Гастон Рамон применил формалин как антисептическое средство для консервации анатоксина. Однако выяснилось, что под действием этого реагента флокулирующая способность молекулы этого «формол-токсоида» сохраняется, а токсичность исчезает полностью.

Вот как описывает открытие сам Рамон: «10 декабря 1923 года в сообщении, представленном в Академию наук самым выдающимся учеником Л. Пастера Эмилем Ру, нами было впервые заявлено о том, что дифтерийный токсин под влиянием одновременного воздействия формалина и тепла полностью утрачивает свои токсические свойства, сохраняя в неприкосновенности способность флокулировать в присутствии антитоксической сыворотки, и вызывает при введении экспериментальному животному развитие антитоксического иммунитета к дифтерии. Этот видоизмененный токсин, превратившийся в новое вещество и характеризующийся безвредностью, иммуногенностью и способностью флокулировать, был обозначен с согласия Ру как *анатоксин*» [2, с. 42—43; 7, с. 597—600].

Итак, дифтерийный токсин при инкубации его в течение 21 дня в смеси с 0,4% формалина при 37°C, сохраняющий антигенность и иммуногенность, но полностью лишенный токсичности, стал первым препаратом для профилактики тех инфекций, в основе патогенеза которых лежит действие секретиремого токсина.

Большой интерес, вызванный сообщением Рамона, легко понять, если вспомнить, как велика была заболеваемость дифтерией в те годы. Во Франции в 1923 г. от дифтерии погибло более 3 тыс. детей [2, с. 8], в Канаде — 1297 [2, с. 105], в США — более 15 тыс. [2, с. 103]. Не лучше обстояли дела и в других странах.

Это величайшее открытие стало основой разработок анатоксинов для профилактики не только дифтерии, но и других смертельных заболеваний, таких как столбняк и ботулизм. При подкожном введении анатоксина у привитых людей развивался стойкий, напряженный иммунитет против дифтерийного токсина.

Благодаря усилиям Гастона Рамона и Парижской медицинской академии во Франции стали широко проводить противодифтерийную иммунизацию населения с помощью анатоксина [2, с. 91]. В 1930 г. вакцинация анатоксином была введена во француз-

²⁹ Иммуногенность — способность вызывать иммунный ответ при введении антигена в макроорганизм.

ской армии, а с 1936 г. ассоциированная вакцинация против дифтерии, столбняка и тифа стала в армии обязательной [2, с. 91]. В том же году во Франции был принят закон о всеобщей вакцинации от столбняка в армии [8, с. 56].

Однако на этом пути были и тернии. Гастон Рамон ошибался, когда писал, что анатоксин проявляет абсолютную стабильность во времени и не проявляет склонность к реверсии [2, с. 54]. К сожалению, анатоксин может реверсировать. Влияет на это ряд факторов: нарушение технологии производства, очистки и процесса детоксикации, нарушение режима хранения препарата и сроков годности. В истории вакцинологии XX в. есть несколько тому примеров, но самый драматический случай произошел в Японии.

В древней столице Японии Киото в середине XX в. с большим энтузиазмом было встречено решение городских властей начать массовую вакцинацию детей против дифтерии анатоксином, приготовленным по способу Рамона. Начинание обернулось катастрофой, разразившейся в 1948 г. Тогда в период 20—22 октября 15 560 детей в возрасте до 13 лет были привиты анатоксином. Вначале все шло благополучно. Вторую прививку сделали 4—5 ноября. Через 1—2 дня заболело 606 человек, из которых в разные сроки умерли 68 детей. При анализе причин катастрофы выяснилось, что изготовитель допустил к использованию две бутылки препарата, в которых сохранялась остаточная токсичность [9].

Этот трагический инцидент стал поводом более тщательно подходить к производству препарата. Со временем прививки анатоксином для профилактики дифтерии стали применять во всем мире. Последние вспышки этого заболевания регистрировали в Западной Европе в 1970-е годы. Не фиксировали эпидемии дифтерии и в Северной Америке.

Как же развивалась ситуация в нашей стране?

В Советском Союзе противодифтерийные прививки были введены в законодательном порядке в 1930-е годы по рекомендации и при активном участии Павла Феликсовича Здродовского³⁰, в течение ряда лет (1922—1930) возглавлявшего созданный им бакинский Институт микробиологии и гигиены. В результате количество случаев дифтерии в нашей стране в период с 1940 до 1967 г. снизилось со 177 тыс. до 2,6 тыс., что позволило отнести дифтерию в разряд так называемых контролируемых инфекций [3, с. 6].

Но в 1990-е годы ситуация в России кардинально изменилась. Развал СССР, потоки мигрантов, про-

блемы с финансированием государственной медицины, антипрививочная пропаганда в средствах массовой информации привели к началу новой эпидемии дифтерии и росту числа заболевших. В целом на территории бывшего СССР к середине 1990-х годов было зарегистрировано около 50 тыс. случаев заболевания дифтерией, более 1700 из которых имели смертельный исход [3, с. 7].

Однако, согласно статистике, среди умерших от дифтерии не было ни одного привитого человека. Эти факты в очередной раз убедительно доказывают целесообразность вакцинации как таковой и лишний раз подтверждают, что открытие Гастона Рамона спасло тысячи жизней и заложило универсальные основы получения вакцинных препаратов для профилактики токсикоинфекций.

Разработка депонированных вакцин в СССР

В послевоенные годы в СССР была принята программа тотальной вакцинации столбнячным и дифтерийным анатоксинами, 13 июля 1957 г. утверждена «Инструкция по профилактике столбняка». Вакцинацию проводили как моновалентными (один анатоксин), так и поливалентными вакцинами, в составе которых дифтерийный и столбнячный анатоксины находились в смеси.

В связи с открытой кампанией массовой иммунизации военнослужащих и гражданского контингента активно изучался вопрос о повышении иммуногенности вакцинных препаратов. Попытки использования адъювантов (веществ, повышающих иммуногенность) применялись давно. В начале XX в. тестировались так называемые масляные вакцины (липовакцины). В качестве адъювантов опробовались и другие вещества и соединения. Гастон Рамон отмечал, что иммуногенность анатоксинов повышается при смешивании их с тапиокой, ланолином и холестерином [2, 10]. Британский иммунолог Александр Гленни (Alexander Glenney, 1882—1965) и соавт. в 1931 г. показали, что добавление неспецифических веществ ведет к образованию «депо» антигена и к его замедленной резорбции, что повышает иммуногенность антигена [11]. В нашей стране с 1940-х годов в качестве адъювантов тестировались различные соединения органической и неорганической природы: алюминиевые квасцы, фосфат алюминия, фосфат кальция, гидрат окиси железа, хлористый кальций и др. Все эти вещества так или иначе повышали иммуногенность дифтерийного и столбнячного анатоксинов. Однако большинство адъювантов были реактогенны, вызывая побочные реакции у иммунизированных.

Исследованием депонированных анатоксинов занимались многие научные коллективы, в том числе научная группа на базе Ленинградского научно-исследовательского института вакцин и сывороток под руководством ученика П. Ф. Здродовского Анатолия Андреевича Воробьева (1923—2006). В результате многолетних исследований был сделан окончательный выбор в пользу геля гидроокиси алюминия. В таком препарате иммуногенность ана-

³⁰ Павел Феликсович Здродовский (1890—1976) — российский и светский врач-инфекционист, микробиолог и иммунолог; в 1922 г. организовал Институт микробиологии и гигиены в Баку. Под его руководством были разработаны методы вакцинации против столбняка, дифтерии и других инфекций. В 1930—1938 гг. работал в Институте экспериментальной медицины (Ленинград), с 1942 г. — в спецлаборатории НКВД над изучением возбудителя сыпного тифа, с 1945 г. — в Институте эпидемиологии и микробиологии АМН СССР (Москва), где продолжал свои исследования в области иммунологии и эпидемиологии бруцеллеза и других инфекционных болезней.

История медицины

токсина повышалась многократно при отсутствии реактогенности [12, 13]. С тех пор российские анатоксины (и аналогичные препараты, производимые во многих других странах мира по сходной технологии) имеют именно такой состав — соответствующий анатоксин, депонированный (адсорбированный) в геле гидрооксида алюминия [14].

Очистка и фракционирование анатоксинов

В конце 1990-х годов в связи с ужесточением требований ВОЗ к чистоте и активности прививочных препаратов, а также с увеличением количества прививок (в связи с эпидемиологической ситуацией в России) этот показатель возрос до 1000 и 1500 ЛФ/мг белкового азота для дифтерийного и столбнячного анатоксинов соответственно. Встал вопрос и о повышении удельной специфической активности препаратов тех производственных серий, где регламентные технологии не позволяли достичь такой активности.

К этому времени уже было хорошо известно, что дифтерийный и столбнячный анатоксины являются полипептидными цепями (белками) с молекулярной массой 61 и 150 кДа соответственно [15]. Попытки фракционировать и очищать анатоксины солевым переосаждением, диализом, электрофорезом и хроматографией предпринимались и ранее. Это связано с тем, что нативные производственные препараты, кроме самого анатоксина, содержат разнообразные низкомолекулярные балластные примеси, в том числе продукты автолиза биомассы и остатки пептидов питательной среды, способные ухудшать качество конечного продукта [16].

Кроме этого, была описана способность столбнячного анатоксина к полимеризации в процессе его обезвреживания формалином и переосаждения. В 1994 г. коллектив лаборатории биомедицинских технологий ММА имени И. М. Сеченова под руководством Михаила Викторовича Далина (1936—2017) и сотрудники предприятия «Биомед имени И. И. Мечникова» разработали технологии очистки и фракционирования анатоксинов с помощью методов ступенчатой ультрафильтрации на полуволонных и плоских фильтрах. Научно-производственной группе удалось не только повысить удельную активность анатоксинов, но и получить новый вариант столбнячного анатоксина, пригодный для вакцинации, — его полимерную фракцию с молекулярной массой более 300 кДа. Исследование и практическое использование такого препарата подтвердили его безвредность, стабильность, высокую удельную антигенную активность и не меньшую иммуногенность по сравнению с препаратом, приготовленным традиционным способом [17, 18].

Заключение

Открытие Гастона Рамона, сделанное 100 лет назад, проложило путь новым наукам, в том числе токсикологии и научной вакцинологии, стимулиро-

вало интерес к исследованию новых и уже известных вакцин. Улучшение свойств депонированных вакцин, адъювантов, фракционирование и изучение молекулярных свойств вакцинных компонентов — следствия этого открытия, которое позволило спасти тысячи жизней. В наши дни в практическом здравоохранении такие заболевания, как дифтерия и столбняк, переведены в разряд *контролируемых инфекций*. Кроме перечисленных в этой работе токсинов, получены также ботулотоксины, энтеротоксины, гемолизины, стрептолизины, цитотоксины, эритрогенины и многие другие экзотоксины, исследование которых позволило глубже понять патогенез соответствующих заболеваний и усовершенствовать методы их профилактики и лечения. И это только начало, продолжение следует...

Исследование не имело спонсорской поддержки.
Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Чехов А. П. Полн. собр. соч. в 30 т. М.; 1986. Т. 8. С. 7—31.
2. Рамон Г. Сорок лет исследовательской работы: Пер. с фр. Под ред. П. Ф. Здродовского. М.: Медгиз; 1962. 459 с.
3. Фролов В. А., Далин М. В. Дифтерийное сердце. М.: РУДН; 1996. 206 с.
4. Далин М. В., Фиш Н. Г. Белковые токсины микробов. М.: Медицина; 1980. 224 с.
5. Gamaleïa N. F. De l'action des ferments solubles sur le poison diphtheritique. C. R. Soc. de Biol. 1892; serie 44:153—5.
6. Ноздрачев А. Д., Марьянович А. Т., Поляков Е. Л., Сибаров Д. А., Хавинсон В. Х. Нобелевские премии по физиологии или медицине за 100 лет. 2-е изд. СПб.: Гуманистика; 2003. 752 с.
7. Erlich P. Über die Constitution des Diphtheriegiftes. *Deutsche Med. Wochenscher.* 1898;38:597—600.
8. Gilbrin, E. Gaston Ramon (1886—1963). Le soixantième anniversaire des anatoxines. *Histoire des Sciences médicales.* 1984;18(1):53—60.
9. Stratton K. R., Howe C. J., Johnston R. B. Jr. Adverse Events Associated with Childhood Vaccines. In: Evidence Bearing on Causality. Part 5. Diphtheria and Tetanus Toxoids. Washington (DC): National Academies Press (US); 1994. 480 p.
10. Ramon G. Sur l'immunisation antitetanique et sur la production de l'antitoxine. *Compt. Rend. Soc. Biol.* 1925;93:508—9.
11. Glenny A. Th., Buttle G. A., Stevens M. F. Rate of disappearance of diphtheria toxoid injected into rabbits and guinea pigs: toxoid precipitated with alum. *J. Pathol. Bacteriol.* 1931;34(2):267—75.
12. Воробьев А. А. Сорбция на гидрооксида алюминия специфического антигена столбнячных анатоксинов различной степени очистки. *ЖМЭИ.* 1955;(7):8—10.
13. Воробьев А. А., Васильев Н. Н., Кравченко А. Т. Анатоксины. М.: Медицина; 1965. 488 с.
14. Воробьев А. А. Иммуногенность депонированного анатоксина в зависимости от степени сорбции антигена. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины.* 1955;(3):70—3.
15. Bizzini B. Structure, composition and principles of detoxication of Diphtheria and Tetanus toxin. In: Proceedings of an informal consultation on the WHO requirements of Diphtheria, Tetanus, Pertussis and combined vaccines (30 May — 1 June 1988, Geneva; Swaziland). Geneva: DHHS & FDA USA; 1991. P. 3—6.
16. Фиш Н. Г. Материалы к характеристике специфического антигена в препаратах дифтерийного анатоксина. М.; 1970.
17. Ермолаев А. В., Далин М. В., Закгейм Д. А. Использование ступенчатой мембранной диафильтрации при производственной очистке столбнячного анатоксина. В сб.: Биомедицинские технологии. Вып. 4. М.; 1996. С. 87—94.
18. Ермолаев А. В., Далин М. В., Якушевич Ю. Е. Способ получения полимерной и олигомерной фракции столбнячного анатоксина. Патент РФ № 2065765; 1996.

REFERENCES

1. Chekhov A. P. Complete works in 30 volumes [*Polnoe sobranie sochineniy v 30 tomakh*]. Moscow; 1986. Vol. 8. P. 7–31 (in Russian).
2. Ramon G. Forty years of scientific research [*Sorok let issledovatel'skoy raboty*]. Translated from French. Ed. by P. F. Zdrodovsky. Moscow: Medgiz; 1962. 459 p. (in Russian).
3. Frolov V. A., Dalin M. V. Diphtheritic heart [*Difteriynoe serdtse*]. Moscow; RUDN; 1996. 206 p. (in Russian).
4. Dalin M. V., Fish N. G. Protein toxins of microbes [*Belkovye toksiny mikrobov*]. Moscow: Meditsina; 1980. 224 p. (in Russian).
5. Gamaleïa N. F. De l'action des ferments solubles sur le poison diphtheritique. *C. R. Soc. de Biol.* 1892; serie 44:153–5.
6. Nozdrachev A. D., Mar'yanovich A. T., Polyakov E. L., Sibarov D. A., Khavinson V. H. Nobel Prizes in Physiology or Medicine for 100 years [*Nobelevskie premii po fiziologii ili meditsine za 100 let*]. 2nd ed. St. Petersburg: Gumanistika; 2003. 752 p. (in Russian).
7. Erlich P. Über die Constitution des Diphtheriegiftes. *Deutsche Med. Wochenscher.* 1898;38:597–600.
8. Gilbrin, E. Gaston Ramon (1886–1963). Le soixantième anniversaire des anatoxines. *Histoire des Sciences médicales.* 1984;18(1):53–60.
9. Stratton K. R., Howe C. J., Johnston R. B. Jr. Adverse Events Associated with Childhood Vaccines. In: Evidence Bearing on Causality. Part 5. Diphtheria and Tetanus Toxoids. Washington (DC): National Academies Press (US); 1994. 480 p.
10. Ramon G. Sur l'immunisation antitéténique et sur la production de l'antitoxinum. *Compt. Rend. Soc. Biol.* 1925;93:508–9.
11. Glenney A. Th., Buttle G. A., Stevens M. F. Rate of disappearance of diphtheria toxoid injected into rabbits and guinea pigs: toxoid precipitated with alum. *J. Pathol. Bacteriol.* 1931;34(2):267–75.
12. Vorob'ev A. A. Sorption on aluminum hydroxide of a specific antigen of tetanus anatoxins with various purification degrees. *J. M. E. I.* 1955;(7):8–10 (in Russian).
13. Vorob'ev A. A., Vasil'ev N. N., Kravchenko A. T. Anatoxins [*Anatok-siny*]. Moscow: Meditsina; 1965. 488 p. (in Russian).
14. Vorob'ev A. A. Immunogenicity of deposited anatoxin depending on the degree of antigen sorption. *Bulleten' eksperimental'noy biologii i meditsiny.* 1955;(3):70–3 (in Russian).
15. Bizzini B. Structure, composition and principles of detoxication of Diphtheria and Tetanus toxin. In: Proceedings of an informal consultation on the WHO requirements of Diphtheria, Tetanus, Pertussis and combined vaccines (30 May — 1 June 1988, Geneva; Swaziland). Geneva: DHHS & FDA USA; 1991. P. 3–6.
16. Fish N. G. Materials for characteristics of a specific antigen in diphtheria anatoxin preparation [*Materialy k kharakteristike spetsificheskogo antigena v preparatakh difteriynogo anatoksin*]. Moscow; 1970 (in Russian).
17. Ermolaev A. V., Dalin M. V., Zakgeym D. A. et al. The use of step-wise membrane diafiltration in the industrial purification of tetanus anatoxin. In: Biomeditsinskie tehnologii. Iss. 4. Moscow; 1996. P. 87–94 (in Russian).
18. Ermolaev A. V., Dalin M. V., Yakushevich Yu. E. Method for obtaining polymeric and oligomeric fraction of tetanus anatoxin. Patent RF N 2065765; 1996 (in Russian).