

УДК 579.871.1:57.033:57.043

МІНЛИВІСТЬ СОМАТИЧНИХ АНТИГЕНІВ КЛІТИННОЇ СТІНКИ *C. DIPHTHERIAE* ПІД ВПЛИВОМ ЕЛЕКТРОННОГО ПУЧКА**Ждамарова Л.А., Складар Н.І.****Інститут мікробіології та імунології ім. І.І.Мечникова АМН України, Харків****ВСТУП**

Незважаючи на спад епідемії дифтерії, який спостерігається починаючи з 1998 року, проблема цієї інфекції залишається актуальною і на сьогодні, більш того час від часу вона гостро постає перед суспільством. Основну загрозу розвитку епідемії створює широко розповсюджене носійство збудника дифтерії. Санація стійких носіїв токсигенних коринебактерій дифтерії відомими засобами часто не дає бажаних результатів.

Увагу фахівців привертає захворюваність на дифтерію та летальність серед повноцінно щеплених осіб.

Аналіз даних доступної нам літератури свідчить про те, що захворюваність на дифтерію обумовлена не тільки зниженням напруженості протидифтерійного колективного імунітету, а, в значній мірі, і адаптаційною мінливістю дифтерійного мікроба, що пов'язано, очевидно, з процесами циркуляції патогенних коринебактерій серед вакцинованого населення та мінливістю збудника дифтерії під впливом факторів зовнішнього середовища. З них в останні роки все більше уваги приділяють фізичним чинникам антропогенного походження, які з кожним днем все ширше застосовуються в медицині, зокрема, дії електромагнітних хвиль на мікроорганізми. Під впливом електромагнітних випромінювань можуть відбуватися як зміни фенотипових ознак, так і на генному рівні, що доведено в численних експериментах різними дослідниками.

Стосовно *Corynebacterium diphtheriae*, в доступній нам літературі зустрічалися лише поодинокі повідомлення [1, 2, 3]. Вони вказують, що електромагнітне випромінювання відіграє роль інформаційних сигналів, які спричинюють вплив на ферментативні системи збудника дифтерії та його адгезивні можливості.

Цілим рядом дослідників був доведений стабілізуючий ефект імпульсного ультрафіолетового опромінення при формуванні однорідних за токсигенною ознакою популяцій коринебактерій дифтерії, що можливо пов'язано з активацією гену *tox*⁺ [4, 5, 6, 7].

Метою роботи став спрямований науковий пошук важливий для більш поглибленого вивчення питань, пов'язаних з ефектами взаємодії ЕМП (електромагнітних полів) та електромагнітних коливань антропогенного походження, з живими субстанціями, експериментально-теоретичне обґрунтування яких може принести двояку користь: розширення наукових знань біологічних особливостей реакцій-відгуків патогенної мікробної клітини на дію фізичного фактора та надання емпіричному використанню ЕМП та електромагнітних коливань штучного походження наукового обґрунтування, без якого неможливий його подальший розвиток.

ОБ'ЄКТ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Об'єктом дослідження були зразки дифтерійної мікробної маси штаму Вейсензее, стандартний дифтерійний діагностикум серії 75 з активністю 1:3200, 4 серії соматичних дифтерійних антигенів, одержаних за допомогою екстракції етилендіамінтетраацетатом.

Для проведення досліджень були взяті 44 морські свинки вагою 250-300 г. Було використано ряд сироваток: протидифтерійна стандартна сироватка, виробництва Ставропольського заводу біологічних препаратів; антитоксичну дифтерійну стандартну сироватку коней, яка містила в 1 мл 10 МОМ; нормальна кінська сироватка виробництва Харківського заводу "Біолек", сироватки крові лабораторних тварин.

Джерелом електронного пучка послужила лабораторна установка, розроблена в Національному науковому центрі Харківського фізико – технічного інституту. Обробка проводилась електронним пучком, що формується резонансним прискорювачем, з енергією до 4 MeV і струмом 1A в імпульсі тривалістю 2 мкс. Основні параметри електронного пучка: енергія електронів, струм пучка, розмір та розташування растра, надійно стабілізуються, що забезпечує високу якість радіаційної обробки.

Опромінення мікробної маси електронним пучком здійснювали у скляних стандартних біологічних пробірках діаметром 10 мм і опромінювали дозою в 1,0 кГр. Дозу розраховували за схемою запропонованою в роботі Ю.Д. Козлова, К.І. Нікуліна та ін. [8]

Далі мікробну масу коринебактерій дифтерії у вигляді пасти білого кольору, заливають етиловим спиртом та ресуспендують. Суспензію витримують 24 години при кімнатній температурі в 2-3 об'ємах етилового спирту. Клітини відділяють від спиртової фази центрифугуванням впродовж 30' на 6000g. Осад відмивали фізіологічним розчином та розтирали в охолоджену 0,8% розчині ЕДТА – Na₂ з pH 7,8-8,1 з кварцевим піском. Кількість розчину ЕДТА береться із розрахунку 2-3 мл на 1 г сирової ваги клітин. Розтерту мікробну масу розміщують в побутовому холодильнику на 17-18 годин. Далі масу центрифугують при 6000 g 30', осад відкидають, а центрифугат центрифугують далі при 18000g. Одержаний екстракт діалізують 48 годин в порівнянні з надлишком дистильованої води, часто змінюючи діалізаційні води. pH дистильованої води доводять до 8,0 за допомогою невеликої кількості 10 N NaOH. Діалізований екстракт концентрують поліетиленгліколем з мм 15-20 тис. Одержаний матеріал контролювали за складом та преципітаційній активності порівнюючи з антидифтерійною сироваткою.

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Керуючись даними попередніх дослідів для подальшого вивчення соматичного антигену C.d. в якості екстрагену було обрано ЕДТА, саме він дає можливість одержати матеріал з більш вираженими антигенними властивостями. З другого боку, резюмуючи вивчення наслідків впливу фізичних факторів антропогенного походження на C.d., доведено, що з усіх вивчених чинників найвагоміший вплив мав електронний пучок. Він був спроможний зменшувати в популяції кількість життєздатних клітин, впливати на токсиногенез та змінювати чутливість дифтерійних тест-культур до протимікробних препаратів [9]. Оскільки вказані біологічні ознаки пов'язані з певною перебудовою геному клітини мікроба – метою було вивчити вплив даного фактора на зміни антигенних властивостей збудника дифтерії.

Експеримент передбачав вивчення токсичності фрагментів клітинної стінки *C. diphtheriae*, одержаних за допомогою етилендіамінтетраацетат – екстракцією. Паралельно вивчались соматичні антигени дифтерійного мікроба, одержаних з патогенів, які попередньо підлягали опроміненню потоком електронів в дозі 1,0 кГр, а також соматичні антигени одержані із мікроорганізмів, які не підлягали впливу даного абіотичного фактору (таблиця 1).

Таблиця 1. Вихід та склад антигенів, виділених із мікробної маси опроміненої ЕП та неопромінених, *C.diphtheriae*

№№	Екстра Генти	Вихід, в % від сухої маси	Склад, мг/мл в 0,5% розчині			Гель преципітація	Міні – мальна преципітуюча доза (мкг)
			Білок	вуглеводи	ліпіди		
1	1% ЕДТА	2,86	8,2±0,6	1,72±0,01	0,09±0,03	1 лінія	28,0

2	1% ЕДТА	2,53	6,9±1,1	1,69±0,01	0,07±0,03	1 лінія (слабо виражена)	62,0
---	------------	------	---------	-----------	-----------	-----------------------------	------

Примітка:

1 – соматичні антигени із неопроміненої мікробної маси;

2 - соматичні антигени із опроміненої мікробної маси.

Експеримент проводили на морських свинках вагою 250 г, яким підшкірно вводили 1 мл препарату. Вміст соматичного антигену в 1 мл препарату, який вводили був в межах: від 18 мг (максимальна вага спроможна розчинитися в 1 мл фізіологічного розчину) до 0,1 мг. Дані проведеного експерименту свідчать про те, що антигени клітинної оболонки патогенних коринебактерій дифтерії характеризувались певною токсичністю. По результатам досліджень: тільки доза 0,1 мг не приводила до смертності лабораторних тварин. При розтині першої групи морських свинок, які одержали соматичний антиген виділений із необроблених потоком електронів дифтерійних мікробів в дозі 0,1 – 0,5 мг антигену, тільки у поодиноких екземплярів було зафіксовано неспецифічне запалення легень. Морські свинки, які загинули від летальних доз антигену, підлягли розтину та детальному вивченню патологоанатомічної картини внутрішніх органів. Місце введення антигену мало набряк, зафіксовані крововиливи в тканини, наявність трансудату в плевральній порожнині, багаточисельні геморагії в легенях, збільшена в розмірах та гіперерована надниркова залоза, а також поодинокі крововиливи в ній.

Декілька іншими виявились результати вивчення патологоанатомічної картини підгрупи лабораторних тварин, які одержали соматичний антиген із опромінених штамів *C. diphtheriae*. Розтин морських свинок, які отримали дози 0,1 – 0,5 мг, показав повну відсутність як специфічного так і неспецифічного запалення. Введення летальної дози в 50,0% випадків привело до смерті тварин. Патологоанатомічна картина біооб'єктів першої та другої підгруп, які загинули від летальних доз, також різнилась. У об'єктів паралельної підгрупи місце введення препарату тільки у 70,0% мало легкий набряк, зафіксовані поодинокі крововиливи в тканини. Трансудат у плевральній порожнині виявлений, але мав замалу кількість, геморагії в легенях не зафіксовані. Спостерігалась характерна гіперемія та поодинокі крововиливи в наднирковій залозі, але адекватний дифтерійний патології набряк цієї залози візуально зафіксувати було неможливо.

Таким чином, виділені клітинні компоненти із опромінених патогенів в експериментальних дослідженнях на лабораторних тваринах, в більшій мірі, викликали легкі та середньої важкості запальні реакції характерні при даній патології.

Викладені вище результати розтину лабораторних тварин дозволяють стверджувати, що одержані соматичні антигени, викликали у біооб'єктів патологоанатомічні зміни, властиві дифтерійному екзотоксину, це дає можливість припуститися думки, що ці зміни пов'язані з наявністю в антигені домішків дифтерійного екзотоксину. Для підтвердження цієї думки було вивчено наявність антитіл до дифтерійного анатоксину в крові імунізованих тварин. З цією метою морським свинкам обох підгруп під шкіру вводили по 1,0 мл антигену в дозах 0,5 та 0,1 мг, а потім через 30 діб із серцевої порожнини лабораторних тварин брали кров з метою виявити в реакції пасивної гемаглютинації присутність антитіл до дифтерійного анатоксину в сироватках крові.

З даних табл. 2 видно, що соматичні антигенні комплекси, одержані з виробничого штаму викликали в щеплених лабораторних тварин утворення антитіл проти дифтерійного токсину. Про це свідчать позитивні серологічні реакції в значних титрах (1 : 80 – 1 : 160).

Опромінення вихідної культури в зазначеному вище режимі привело до зниження активності токсинуотворюючої функції в еталонного штаму коринебактерії дифтерії. Вакцинація по аналогічній схемі лабораторних тварин антигенним комплексом, викликала менш інтенсивний розвиток гуморального протитоксичного імунітету. Нейтралізуючі токсин антигіла визначались в низьких титрах (1 : 10 – 1 : 20).

Таблиця 2. Титри антитіл протидифтерійного анатоксину в сироватках крові лабораторних тварин, на чотирнадцятий день після імунізації їх антигенами з неопромінених і опромінених бактерій *C.diphtheriae*

Імунізація проводилась антигенами бактерій	Кількість сироваток	Титри гемаглютининів					
		1 : 10	1 : 20	1 : 40	1 : 80	1 : 80	1 : 160
неопромінених	10	0	0	0	0	4	6
опромінених	10	3	7	0	0	0	0

Беручи до уваги, що в останні десятиріччя в літературі запропоновано використання індикації токсичності дифтерійного токсину культури тканини, була проведена оцінка токсичності соматичних антигенів шляхом титрації їх на людських лімфоцитах периферичної крові. Використання цієї культури тканини дозволяє також виявити токсичність одержаних соматичних антигенів. Застосування вказаного методу в досліді не дозволило встановити кореляцію між рівнем токсичності антигенного комплексу, який вивчали за допомогою цього методу, та при щепленні ним лабораторних тварин.

Важливо відмітити, що рівень вираженості токсичності одержаний в попередніх досліді відрізнявся від токсичності соматичних антигенів, які одержували інші дослідники. Можливо це пов'язано з методом виділення антигенів, так як в даних експериментах були застосовані малоруйнівні методи екстракції, що дозволяє зберегти інтактність молекул антигенів та запобігти їх деградації.

ВИСНОВКИ

1. Показано, що соматичні антигени одержані із опроміненої мікробної маси електронним пучком в дозі 1 кГр різнились за мінімальною преципітуючою дозою та відсотком складових.
2. Доведено, що включення в технологію вилучення клітинних структур опромінених електронним пучком токсинсинтезуючих коринебактерій дає можливість зменшити вихід білка за рахунок зниження питомої ваги екзотоксину.
3. Встановлено, що рівень токсичності соматичних антигенів *C. diphtheriae* із опроміненої маси був значно нижчим у порівнянні із соматичними антигенами, одержаними із неопроміненої маси.

ЛІТЕРАТУРА

1. Мониторинг биологических свойств возбудителей дифтерии и коклюша в условиях воздействия низкоэнергетических вращающихся магнитных и электронных полей оптического и радиочастотного

- диапазонов /Бирюкова С.В., Манина Ж.Н., Грабина В.А., Колоколова О.Б.// Тез. Междунар. Конгресса «Ликвидация и элиминация инфекционных болезней-прогресс и проблемы».-С-Петербург, 2003.-С.22.,
2. Афромеев В.И., Хадарцев А.А., Яшин А.А. Биофизика полей и излучений и биоинформатика. Основы физико – биологической и технической реализации управляющих воздействий высокочастотными электромагнитными полями в медицине /Под. Ред. Яшина А.А. – Тула: НИИ НМТ Тульск. гос. ун-та, 1999. –С 111. – 508с.
 3. Манина Ж.Н., Бирюкова С.В., Яковлева З.И., Определение степени воздействия низкоэнергетических полей оптического (лазер) и радиодиапазона (миллиметровые волны) на ферментативную и адгезивную активности коринебактерий дифтерии //Сб. матер. Итоговой региональной научно-практической конференции “Эпидемиол., эколог. и гигиена”.-Харьков, 1999. –В.2.-С. 34-35.
 4. Девятков Н.Д., Голанд М.Б., Тагер А.С. Роль синхронизации в воздействии слабых сигналов миллиметрового диапазона на живые организмы. Эффекты нетеплового воздействия миллиметрового излучения на биологические объекты. // ИРЭ.-1983.- № 3.- С.7-17.
 5. Девятков Н.Д. Влияние электромагнитного поля миллиметрового диапазона длин волн на биологические объекты // Успех физических наук. – М., 1973.- В. 110.- №3.- С.453-454.
 6. Кузнецова Л.М. Мутагенное действие УФ – света и химических агентов на термоиндуцируемый профаг: Автореф. дис. ... канд.биол. наук.- ЛГУ им. Жданова, 1985. – 16с.
 7. Куляш Ю.В., Лепилин А.В., Семенова О.П., Куцемалко Р.Т. Комбинированное влияние лазерных излучений и переменных магнитных полей на стафилококки // Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунол. – 1998.- №5. – С.- 33- 36.
 8. Козлов Ю.Д., Никулин К.И., Тихонов Ю.С. Расчет параметров и конструирование радиационно-химических установок с ускорителями электронов.- М.: Атом, 1989. –176с.
 9. Бабич Є.М., Ждамарова Л.А., Катрич В.А., Кийко В.І., Калініченко С.В., Скляр Н.І., Кисельов В.А. Вплив електромагнітного поля НВЧ діапазону та електронного пучка на патогенні коринебактерії//Анали Мечніковського інституту.-2003.- № 4-5.- С. 69-72.

УДК 579.871.1:57.033:57.043

МІНЛИВІСТЬ СОМАТИЧНИХ АНТИГЕНІВ КЛІТИННОЇ СТІНКИ *S. DIPHThERIAE* ПІД ВПЛИВОМ ЕЛЕКТРОННОГО ПУЧКА

Ждамарова Л.А., Скляр Н.І.

Інститут мікробіології і імунології ім. І.І.Мечникова АМНУ

E-mail : imiamn@mail.ru web:www.hniimi.da.ru

В роботі вивчали вплив електронного пучка на мікробну клітину. Об'єктом дослідження були зразки мікробної маси штаму Вейсензее; 4 серії соматичних дифтерійних антигенів, одержаних із опроміненої та неопроміненої електронним пучком мікробної маси, екстракцією етилендіамінтетраацетатом. Паралельним дослідом доведено, що електронний пучок може впливати на кількість та склад соматичних антигенів (2,86% та 2,55%) білок ($8,2 \pm 0,6$) та ($6,9 \pm 1,1$); на рівень мінімальної преципітуючої дози, в сторону збільшення (з 28,0 до 62,0); на функцію токсиноутворення; на токсичність одержаних антигенів.

Ключові слова: мікробна маса, соматичні антигени, електронний пучок.

УДК 579.871.1:57.033:57.04

ИЗМЕНЧИВОСТЬ СОМАТИЧЕСКИХ АНТИГЕНОВ КЛЕТОЧНОЙ СТЕНКИ *S. DIPHThERIAE* ПОСРЕДСТВОМ ЕЛЕКТРОННОГО ПУЧКА

Ждамарова Л.А., Скляр Н.І.

Институт микробиологии и иммунологии им. И.И. Мечникова АМНУ

E-mail : imiamn@mail.ru web:www.hniimi.da.ru

В работе изучали влияние электронного пучка на микробную клетку. Объектом исследования были образцы микробной массы штамма Вейсензее; 4 серии соматических дифтерийных антигенов, полученных из

облученной и необлученной электронным пучком микробной массы посредством экстракции этилендиаминтетраацетатом. Параллельным экспериментом доказано, электронный пучок может оказывать воздействие на выход и состав соматических антигенов (2,86% и 2,53%) белок ($8,2 \pm 0,6$) и ($6,9 \pm 1,1$); на уровень минимальной преципитирующей дозы в сторону увеличения (с 28,0 до 62,0); на функцию токсинообразования; на токсичность полученных антигенов.

Ключевые слова: микробная масса, соматические антигены, электронный пучок.

UDC 579.871.1:57.033:57.043

CHANGEABILITY OF SOMATIC ANTIGENS OF *C. DIPHTHERIAE* CELL WALL UNDER INFLUENCE OF ELECTRON BEAM

Zhdamarova L.A., Sklyar N.I.

I.Mechnikov Institute of microbiology and immunology AMSU

E-mail : imiamn@mail.ru web: www.hniimi.da.ru

Influence of electron beam on microbe cell was studied in this paper. As objects there were used samples of microbe mass of Vaisenzee strain; 4 series of somatic diphtheria antigens obtained by means of EDTA extraction from microbe mass irradiated and non- irradiated by electron beam. It was proved, by parallel experiment, that electron beam is capable to effect on yield and composition of somatic antigens (2,86 % and 2,53 %), protein ($8,2 \pm 0,6$); level of minimal precipitating dose in the direction of increase (from 28,0 to 62,0); function of toxin production; toxicity of strains obtained.

Key words: microbe mass, somatic antigens, electron beam