УДК 576.3:576.8.097.2:615.9

ОЦЕНКА ТОКСИЧНОСТИ АНТИГЕНОВ БУРКХОЛЬДЕРИЙ НА РАЗНЫХ ТИПАХ КЛЕТОК

С.И. Жукова, Ф.К. Адельшин, Н.П. Храпова, Н.Н. Пивень, О.Б. Прошина, А.В. Засядкина, Н.Г. Плеханова

Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт, кафедра биологии ВолГМУ

Род бактерий Burkholderia включает в себя патогенные и непатогенные виды. Патогенные представители этого рода – возбудители сапа (B.mallei) и мелиоидоза (B.pseudomallei) вызывают инфекционные заболевания, относящиеся к группе особо опасных. До настоящего времени не разработаны эффективные вакцины против этих инфекций, хотя работа в этом направлении проводится как в нашей стране, так и за рубежом уже более полувека. Важным этапом при отборе протективных антигенов возбудителей в качестве возможных компонентов вакцины является исследование их токсических свойств.

Для исследования токсичности наряду с лабораторными животными используются другие биологические тест-объекты: культуры клеток и тканей, макрофаги, простейшие организмы (инфузории) [3,4], причем последние вызывают постоянно возрастающий интерес исследователей в связи с возможностью в короткие сроки получить ценную информацию о биологическом действии веществ. Выбор инфузорий как модели для исследования привлекателен еще и тем, что они, будучи клеткой и организмом одновременно, позволяют оценивать разнообразные воздействия как на клеточном уровне, так и на уровне всего организма этого класса простейших.

ЦЕЛЬ РАБОТЫ

Изучить токсичность водно-солевых экстрактов (ВСЭ) буркхольдерий для разных типов клеток с целью отбора наиболее информативного тест-объекта и метода тестирования токсичности.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Для изучения токсичности использовали водно-солевые экстракты (ВСЭ) буркхольдерий: B.pseudomallei С-141, B.mallei В-120, B.thailandensis (непатогенный вид). В качестве контрольного препарата, известного своей высокой токсичностью, цитопатогенным и иммуносупрессивным действием, был выбран актиномицин С (Serva). Тест-объектами являлись клетки мышиных фибробластов L-929, клетки овариальной опухоли китайского хомячка СНО К – 1, перитонеальные макрофаги (ПМ) мышей BALB/C и инфузории Paramecium candatum. Клетки L-929, СНО К-1 и ПМ в концентрации 200 тыс. кл/мл культивировали в 96-луночных планшетах, по 100 мкл на лунку, при температуре 37 °С в присутствии 5 % CO_2 в среде RPMI-1640 с 2 mM L-глютамина, 1 mM пирувата натрия, 5 mM Hepes. Для забора ПМ мышам BALB/C в брюшную полость вводили 8 мл среды 199, отсасывали взвесь ПМ, отмывали 1 раз средой 199 при 1000 об/мин, ресуспендировали в полной питательной среде RPMI-1640 и доводили до 200 тыс. кл/мл. После 24 ч инкубации среду в планшетах с клетками меняли на свежую, затем вносили исследуемые антигены по 100 мкл и титровали в лунках планшеты. Токсичность антигенов оценивали через 24 ч инкубации, просматривая планшеты в инвертированном микроскопе. Мертвые клетки были более темными, имели неровные контуры, зернистость, дефекты в клеточной стенке. Токсичность антигенов оценивали по показателю ЦТЕ 50-концентрации антигена, вызывающий гибель 50 % клеток в лунке [3]. При тестировании токсичности антигенов на инфузориях за токсическую дозу принимали концентрацию антигена, снижающую на 50 % частоту сокращений выделительных вакуолей инфузорий (ЦТЕ 50). Для определения токсичности 100 мкл раствора антигена смешивали в лунке планшеты с 100 мкл культуры инфузорий и через 3 мин экспозиции при комнатной температуре 25 мкл смеси помещали на предметное стекло, добавляли несколько волокон ваты для ограничения подвижности инфузорий, сверху накрывали покровным стеклом, и микроскопировали препараты в световом микроскопе с использованием синих светофильтров или фазовоконтрастного устройства, позволяющих четко просматривать органеллы клеток. В контроле к культуре инфузорий вместо антигена добавляли физраствор. При микроскопировании препаратов подсчитывали число сокращений сократительных вакуолей в мин у 6–7 инфузорий, затем вычисляли средние показатели для каждой концентрации антигена. Все антигены исследовали на разных типах клеток в 6 повторностях. Кроме того, при работе с инфузориями определяли концентрации антигенов, которые через 3 мин экспо-

зиции вызывали тотальную гибель клеток (DCL).

Питательной средой для выращивания инфузорий являлся настой лугового сена (10 г на 1 л воды), который кипятили 15 мин для элиминации всех простейших и их цист. Через 2–3 сут. из спор сенной палочки, сохранившихся после кипячения, развивались бактерии, необходимые для питания парамеций [2]. В готовый питательный раствор вносили культуру инфузорий, которую затем культивировали при комнатной температуре и интенсивном солнечном освещении. Статистический анализ результатов исследований осуществляли с определением средних величин и доверительных интервалов для уровня достоверности 95 % [1].

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

При изучении токсичности антигенов буркхольдерий на перевиваемых клеточных линиях CHO K-1, L-929 и ПМ было показано, что наиболее чувствительными к токсическому действию были клетки CHO K-1, промежуточное положение занимали клетки L-929, наиболее резистентными оказались ПМ мышей BALB/C (табл.).

Токсичность антигенов для инфузорий по критерию ЦТЕ 50 в наибольшей степени коррелировала с токсичностью для клеток CHO K-1. Следует отметить, что концентрации антигенов, вызывающие тотальную гибель инфузорий, в 8–26 раз превышали дозы, угнетающие на 50 % их выделительную функцию (рис.).

Таблица

Токсичность водно-солевых экстрактов буркхольдерий для разных типов клеток

Препарат	Токсичность, мкг/мл (M±m)			
	CHO K-1	L-929	ПМ	P.caudatum
ВСЭ B.pseudomallei C-141	2,76±0,71	3,52±0,86	8,36±1,62	3,02±0,96
ВСЭ B.mallei B-120	2,83±0,54	6,4±1,68	18,06±2,44	2,14±0,59
ВСЭ B.thailandensis	3,83±1,56	4,46±1,8	9,0±1,9	3,82±1,1
Актиномицин С	0,17±0,03	0,91±0,13	0,40±0,07	0,33±0,06

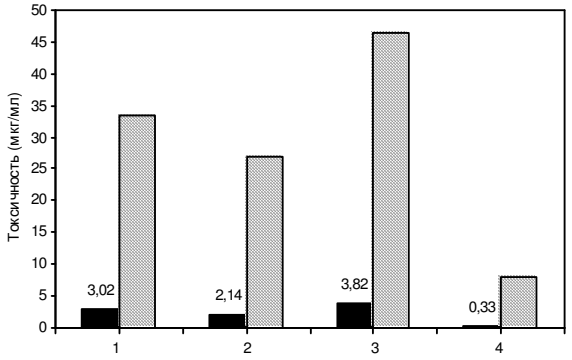

Рис. Соотношение токсических доз антигенов буркхольдерий, вызывающих у инфузорий Paramecium caudatum угнетение выделительной функции и гибель клеток:
1 – ВСЭ P.pseudomallei C-141; *2* – ВСЭ B.mallei B-120; *3* – ВСЭ B.thailandensis; *4* – актиномицин С;
■ – ЦТЕ 50; ⊠ –DCL

Актиномицин С, как контрольный токсический препарат, превосходил по токсичности антигены буркхольдерий при тестировании на клетках CHO K-1 в 16–22 раза, на ПМ – в 20–45 раз, на клетках L-929 в 4–7 раз, на инфузориях – в 6–12 раз. В процессе исследования токсичности антигенов на инфузориях было отмечено, что одним из легко наблюдаемых последствий контакта антигенов с инфузориями было снижение частоты сокращений сократительных вакуолей, одна из которых расположена в передней части тела, другая – в задней. Число сокращений вакуолей в мин (частота пульсации), которое в нормальных условиях при температуре 28–30 °С составляло 7–8, сокращалось до 1–0 при добавлении в среду бактериальных антигенов. После полной блокады выделительной функции инфузорий объем сократительных вакуолей значительно увеличивался. Следующим этапом губительного действия токсина являлись грубые морфологические изменения в клеточной стенке инфузорий в виде множественных округлых выростов ("вакуолизация" клеточной стенки), которые затем разрывались, вследствие чего наступала полная деструкция клетки.

Как показали наши исследования, метод оценки токсичности антигенов буркхольдерий на инфузориях Paramecium candatum сравним по чувствительности с тестированием на перевиваемых клеточных линиях CHO K-1 и L-929, однако выгодно отличается возможностью получения быстрого ответа и определения токсичности на физиологическом уровне.

Описанные в литературе методы оценки токсичности на инфузориях основаны, как правило, на регистрации токсичного эффекта по реакции жизнь – смерть [4, 5]. Некоторые авторы предлагают определять токсичность по степени задержки роста культуры инфузорий Tetrahy-

mena pyriformis при добавлении в нее исследуемого вещества [6]. Однако, в этом случае необходимо суточное культивирование и многократный подсчет числа инфузорий в камере Горяева, для чего они предварительно отрабатываются формалином. Кроме того, остается неясной основная причина снижения численности популяции инфузорий. Она может быть связана с частичной гибелью клеток, или с нарушением процесса размножения или с другими неизвестными факторами. Использованный нами метод оценки токсичности на парамециях по критерию угнетения на 50 % их выделительной функции значительно чувствительнее методов, основанных на регистрации гибели клеток, так как позволяет определять токсические дозы, нарушающие жизнедеятельность инфузорий без необратимых морфологических изменений, неизбежно ведущих к разрушению клеток. Важным преимуществом данного метода являются простота и доступность, что позволяет использовать его в любой санитарно-бактериологической лаборатории, тогда как работа с перевиваемыми клеточными линиями достаточно сложна и невозможна без специального оборудования и реактивов (CO_2 – инкубатор, ламинарный шкаф, сложные питательные среды).

ЛИТЕРАТУРА

1. *Ашмарин И.П., Воробьев А.Н.* Статистические методы в микробиологических исследованиях. – Л., 1962. – С. 10–21.

2. *Зеликман А.Л.* Практикум по зоологии беспозвоночных. – М.: Высшая школа, 1969. – С. 31.

3. *Сальникова О.И.* Тестирование и изучение токсинов холерного вибриона в культуре монослойных клеток: дис. ... канд. биол. наук. – Ростов-на-Дону, 1994.

4. *Храмченкова Т.А., Громова О.В., Киреев М.Н.* и др. // Пробл. особо опасных инф. – Саратов, 2000. – № 1. – С. 109–113.

5. *Цикуниб А.Д.* // Клин. лаб. диагностика. – 2001. – № 6. – С. 50–52.

6. *Этлин С.Н., Лахонина Г.М., Ирлина И.С.* и др. // Гигиена и санитария. – 1987. – № 9. – С. 80–82.

Zhukova S.I., Adel'shin F.K., Khrapova N.P., Pyven' N.N., Proshina O.B., Zasyadkina A.V., Plekhanova N.G. Evaluation of toxicity of antigens of burkholderies in different types of cells // Vestnik of Volgograd State Medical University. – 2005. – № 1. – P. 16–18.

The results of exaluation of toxicity of water-salt extracts of pathogenic burkholderies (B.pseudomallei, B.mallei) and non-pathogenic (B.thailandensis) variants in four types of cells: mice fibroblasts L-929, cells of Chinese hamster ovarial tumor, CHO KI-1, mice BALB/c macrophages and infusoria Paramecium caudatum were presented. It was shown that as for sensitivity method of defifnition of toxicity in infusoria is close to testing in cells CHO K-1 and L-929. Defining toxicity toses causing death of infusoria but not damaging them may be simple and accessible.

УДК 612.013:615.851:717-084

ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ ПРОФИЛАКТИЧЕСКОЙ КОРРЕКЦИИ ФУНКЦИОНАЛЬНОГО СОСТОЯНИЯ ЧЕЛОВЕКА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МЕТОДОВ ПСИХИЧЕСКОЙ РЕГУЛЯЦИИ

Г.А. Севрюкова

Кафедра нормальной физиологии ВолГМУ

Динамика психофизиологических показателей и вегетативных реакций на моделируемые эмоциогенные нагрузки: "Модель – экзамена"; "Зеркальная координометрия"; "Проба падения с колен", в основе которых положены обстановочные конфликтные ситуации эмоционально-мотивационного, сенсорно-операционного и активационно-эффекторного происхождения свидетельствует о снижении работоспособности и общих функциональных резервов организма студентов, что указывает на возможность неполного восстановления и, как следствие, кумуляции явлений утомления и нервно-психического напряжения [1, 3]. Следовательно, возникает необходимость создания профилактических мероприятий, направленных на оптимизацию процесса адаптации студентов к условиям обучения в вузе [6].

Под системой профилактических мероприятий, направленных на укрепление здоровья, восстановление функционального состояния и работоспособности, сниженных под влиянием учебной нагрузки, следует понимать комплекс методов функциональной коррекции психофизиологического состояния человека [5, 8]. В связи с этим настоящее исследование было посвящено оценке эффективности профилактической коррекции функционального состояния организма студентов с использованием методов психической регуляции (аутотренинг, гетеросуггестия). В качестве формулы внушения применялась установка на расслабление, ощущение тепла и приятной тяжести в мышцах с одновременным использованием специально подобранного музыкального