

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 инфузورий 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 мышинных фибробластов L-929, клетки овариальной опухоли китайского хомячка СНО К – 1, перитонеальные макрофаги (ПМ) мышей BALB/C и инфузории

Paramecium caudatum. 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 % CO₂ в среде RPMI-1640 с 2 mM L-глутамина, 1 mM пирувата натрия, 5 mM Нерес. 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 инфузورий (ЦТЕ 50). Для определения токсичности 100 мкл раствора антигена смешивали в лунке планшеты с 100 мкл культуры инфузурий и через 3 мин экспозиции при комнатной температуре 25 мкл смеси помещали на предметное стекло, добавляли несколько волокон ваты для ограничения подвижности инфузурий, сверху накрывали покровным стеклом, и микроскопировали препараты в световом микроскопе с использованием синих светофильтров или фазово-контрастного устройства, позволяющих четко просматривать органеллы клеток. В контроле к культуре инфузурий вместо антигена добавляли физраствор. При микроскопировании препаратов подсчитывали число сокращений сократительных вакуолей в мин у 6–7 инфузурий, 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 спорсенной 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 СНО К-1, L-929 и ПМ было показано, что наиболее чувствительными к токсическому действию были клетки СНО К-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 СНО К-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 ($M \pm m$)			
	СНО К-1	L-929	ПМ	P.caudatum
BCЭ B.pseudomallei C-141	2,76±0,71	3,52±0,86	8,36±1,62	3,02±0,96
BCЭ B.mallei B-120	2,83±0,54	6,4±1,68	18,06±2,44	2,14±0,59
BCЭ 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

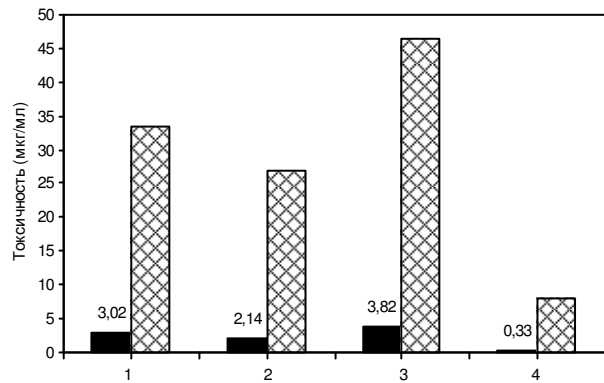


Рис. Соотношение токсических доз антигенов буркхольдерий, вызывающих у инфузорий *Paramecium caudatum* угнетение выделительной функции и гибель клеток:

1 – BCЭ *P.pseudomallei* C-141; 2 – BCЭ *B.mallei* B-120; 3 – BCЭ *B.thailandensis*; 4 – актиномицин С;

■ – ЦТЕ 50; ▨ – DCL

Актиномицин С, как контрольный токсический препарат, превосходил по токсичности антигены буркхольдерий при тестировании на клетках СНО К-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 caudatum* сравним по чувствительности с тестированием на перевиваемых клеточных линиях СНО К-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 *Tetrahya*

(13)

мена 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 обрабатываются 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. Используемый 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, то-

гда как работа с перевиваемыми клеточными линиями достаточно сложна и невозможна без специального оборудования и реактивов (CO₂ – 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., Куреев 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 evaluation 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 ovarian tumor, CHO K1-1, mice BALB/c macrophages and infusoria *Paramecium caudatum* were presented. It was shown that as for sensitivity method of definition 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