

Експериментальна медицина та морфологія

УДК 616.921.8+576.851.

О.Ю.Ісаєнко

ВИВЧЕННЯ ТОКСИЧНИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ АНТИГЕНІВ *B.PERTUSSIS*, ОТРИМАНИХ У РІЗНИХ ЧАСТОТНИХ ДІАПАЗОНАХ УЛЬТРАЗВУКУ

Лабораторія специфічної профілактики краплинних інфекцій (зав. – проф. С.М.Бабич),
Державна установа „Інститут мікробіології та імунології ім. І.І.Мечникова АМН України”, м. Харків

Резюме. Вивчено токсичність антигенних комплексів та їх фракцій, отриманих із *B.pertussis* за допомогою низько-, середньо- та високочастотного ультразвуку. Визначені дермонекротичні властивості зазначених антигенів *B.pertussis*.

Ключові слова: ультразвук, антигени, *Bordetella pertussis*.

Вступ. Збудник коклюшу вирізняється складною побудовою антигенного комплексу, з якого при хімічній дезінтеграції виділяється екзотоксин, ентеротоксин, гемаглютинін, аглютинін, аденілатциклаза. Зазначені компоненти можуть негативно впливати на макроорганізм у вигляді розвитку гарячки, судомного синдрому, енцефалопатії, алергічних реакцій. Різномісність ускладнень та їх тяжкий перебіг диктує необхідність ретельного вивчення ступеня безпечності кожної нової антигенної фракції даного патогену.

У роботі як маловивчені антигени виступають клітинні компоненти нативного походження, що отримані за допомогою ультразвуку в різних частотних діапазонах та хроматографічного розподілу дезінтегратів. Такі фракції можуть суттєво відрізнятися за структурою від антигенів, одержаних за допомогою хімічних методів, і, до того ж, є повністю позбавленими домішок реагентів, що застосовуються в сучасних технологіях приготування вакцин.

Перспективність їх застосування у вакцинології не визначена. У літературі відсутні дані стосовно імуногенних властивостей та не встановлені токсичні ознаки зазначених антигенів.

Мета дослідження. Визначити токсичні властивості нативних антигенів, що виділені за допомогою ультразвукової дезінтеграції мікробних клітин *B.pertussis*.

Матеріал і методи. Для звільнення протективних комплексів із мікробних клітин *Bordetella pertussis* нами використані ультразвукові коливання з різними частотами. У роботі застосовано три ультразвукових дезінтегратори: ГЗ – 109 (60 кГц) потужністю 5 Вт, ТУ 3468 - 001 – 42369179 - 03 (130 кГц) потужністю 9 Вт та УД – 1 (1,6 мГц) потужністю 3 Вт. Опромінення дослідних суспензій у низькочастотному діапазоні здійснювали впродовж 7 годин, середньочастотному – 5 годин, високочастотному – 1 години. Біохімічні

дослідження здобутих білкових речовин визначали за методом Лоурі. Розподіл за молекулярними масами та гомогенність отриманих комплексів проводили за допомогою капілярного гелелектрофорезу на біоаналізаторі «Agilent 2100». Фільтрацію дезінтегратів здійснювали через мембрани «Владипор» МФАС – Б № 4 з діаметром пор 0,2 мкм. Фільтрати, вилучені після озвучення ультразвуком, додатково концентрували упарюванням. Фракціонування антигенних білкових комплексів (УФК) на окремі антигени (УФА – з молекулярними масами ≥ 1000 кДа, УФВ – з молекулярними масами 8,1 кДа, УФС – з молекулярними масами в діапазоні 2,6-3,0 кДа) проводили на хроматографі фірми LKB (Швеція).

Тест-об'єктами служили виробничі штами *Bordetella pertussis* № 267 і № 475 (надані Харківським ЗАТ «Біолік»).

Токсичність субстанцій оцінювали згідно з документацією ВООЗ та "Аналітична нормативна документація на кашлюкову суспензію" (ЗАТ «Біолік») у тесті зміни маси мишей, а також за наявністю дермонекротичних властивостей [1-4].

До експерименту брали безпородних білих мишей, які рівномірно набирали масу тіла протягом 3-4 діб спостереження. Тварин розподіляли на 17 дослідних та дві контрольні групи – по 10 мишей у кожній. Дослідним мишам у черевну порожнину вводили безклітинний препарат в об'ємі 0,5 мл. Одна контрольна група тварин одержала таку ж кількість коклюшної вакцини, друга – фізіологічний розчин. Тварин зважували безпосередньо перед введенням антигенного матеріалу, а також на 3-ю та 7-у доби після введення препаратів.

За характером зміни маси тіла мишей (3-ю та 7-у доби) розраховували абсолютний та відносний приріст маси тіла мишей. Абсолютний приріст визначали за різницею маси мишей на 7-у добу після введення препарату порівняно з поча-

тковою масою. Відносний приріст встановлювали по відношенню маси вакцинованих мишей до таких же показників контрольної групи, вираженого у відсотках.

Дермонекротичні властивості визначали шляхом внутрішньошкірного уведення дослідних препаратів у дозі 0,2 мл цільної та розведеної суспензії мурчакам масою 300 г та кролям масою 2 кг. Кінцевий результат дослідів оцінювали через 96 годин за наявністю або відсутністю некрозу в місцях уведення препарату.

Статистичну обробку отриманих даних проводили за допомогою комп'ютерних програмних пакетів Microsoft Excel 2003 і "Biostat-4" з використанням критерію Стюдента. Для порівняння виражених у відсотках значень використовували критерій χ^2 (достовірність $P < 0,05$).

Результати дослідження та їх обговорення.

При проведенні досліджень виходили з даних літератури, що дермонекротичний токсин та ендотоксин відповідають за первинну токсичність та зменшення маси тварин упродовж перших двох діб після уведення препарату, тоді як лімфоцитозстимулювальний фактор зумовлює повільний приріст маси тварин та прояву шкірних реакцій, починаючи з третьої доби.

Дози антигенних комплексів визначали за допомогою розрахунку загального білка клітинної коклюшної вакцини. Для цього суспензію промислового штаму зі щільністю 10 МОО – 10 млрд. мікробних клітин (цією концентрацією заражають мишей при вивченні токсичності кашлюкового компонента вакцини АКДП) опромінювали низько- й середньочастотним ультразвуком, після чого в дезінтегратах визначали кількість загального білка, яка становила $256,6 \pm 19,6$ мкг/мл ($P < 0,05$). Далі проводили фракціонування антигенних комплексів (УФК) на окремі антигени (УФА, УФВ, УФС) та в кожній фракції, з урахуванням її питомої ваги відносно всього цільноклітинного комплексу, визначали кількість загального білка. Для високочастотних ультразвукових антигенів розрахунок проводили аналогічним чином, з урахуванням того, що концентрація загального білка в комплексі УФК становила $415,3 \pm 0,2$ мкг/мл ($P < 0,05$). Виходячи з отриманих даних визначені індивідуальні дози для кожного окремого антигену. Для вивчення токсичності в тесті зміни маси мишей низькочастотними антигенами заражали в дозах: УФА – 16,7 мкг; УФВ – 160 мкг; УФС – 33,2 мкг, середньочастотні препарати в концентраціях: УФА – 3,3 мкг; УФВ – 167,7 мкг; УФС – 26,1 мкг, а високочастотні фракції вводили відповідно: УФА – 23,2 мкг; УФВ – 333,7 мкг; УФС – 15,3 мкг загального білка.

При оцінці результатів брали до уваги, що кашлюкова суспензія вважається нешкідливою, якщо через 72 години групова маса мишей не нижче маси їх тіла перед уведенням препарату; а через 7 діб відносний приріст маси дослідних тварин становить не менш 60 % приросту маси

контрольних мишей в умовах відсутності загибелі тварин.

При уведенні антигенного комплексу (ультразвуковий фільтрат – УФК), отриманого в результаті низькочастотної дезінтеграції промислового штаму *Bordetella pertussis* № 267, відмічено падіж тварин за три доби спостереження (табл.). Рання загибель мишей свідчать про наявність у цьому препараті ендотоксину або дермонекротичного токсину.

Зараження тварин очищеними компонентами даного антигенного комплексу (УФА - фракція з молекулярною масою ≥ 1000 кДа та УФВ – фракція з молекулярною масою 8,1 кДа) показало такі результати. Маса дослідних тварин перевищувала показники відносного приросту контрольної групи більш ніж на 60 %, що свідчить про відсутність токсичних властивостей цього препарату. Протилежні результати отримані при вивченні токсичності антигену з молекулярною масою 2,9 кДа. Уведення мишам зазначеної фракції викликає зменшення відносного приросту маси дослідних мишей після третьої доби експерименту, що вказує на прояв пізньої токсичності даного препарату.

Водночас вивчали наявність дермонекротичного фактору в антигенному комплексі (УФК) та очищених його антигенах (УФА та УФВ), отриманих із промислового штаму *Bordetella pertussis* № 267 внаслідок озвучення низькочастотним ультразвуком. Вищезазначені препарати вивчали в таких дозах: комплексний у концентраціях 2,7-32 мкг й окремі фракції в кількості 2,7-27 мкг (загального білка). Результати проведеного дослідження показали, що в місці уведення некротичне пошкодження не спостерігалось, навіть при збільшенні розрахованої дози в декілька разів.

При вивченні токсичності антигенного комплексу (УФК), отриманого в результаті дезінтеграції середньочастотним ультразвуком промислового штаму *Bordetella pertussis* № 267, як і у випадку з низькочастотними препаратами, спостерігалась загибель мишей за три дні від початку експерименту. Це доводить прояв первинної токсичності і є показником наявності ендотоксину або дермонекротичного токсину. При уведенні окремих антигенних фракцій (≥ 1000 кДа, 8,1 кДа, 3,0 кДа) спостерігалось перевищення маси тіла мишей на 60 % та більше відносно контрольної групи тварин. Лише при зараженні очищеним антигеном з молекулярною масою 420 кДа навіть у дозі 15,1 мкг (загального білка), маса тварин зменшувалась відносно показників контрольної групи впродовж всього експерименту. До того ж, відмічали загибель мишей. Слід зазначити, що ця фракція з'являється лише в результаті застосування середньочастотного ультразвуку.

Паралельно проведено вивчення дермонекротичних властивостей антигенного комплексу (УФК) у дозах 24, 36, і 48 мкг загального білка показало наступні результати (фото).

Таблиця

Середні показники маси мишей, абсолютного та відносного приросту маси тварин після уведення антигенів дезінтегрованих ультразвуком у різних частотних діапазонах

Частотний діапазон	Антигени та фракції по молекулярній масі, кДа	Кількість білка, мкг	Маса мишей, середні показники за трьома дослідями (M±m)			Середні показники	
			до уведення	через 72 години після уведення пацірж мишей	через 7 діб після уведення	абсолютного приросту мишей, грам, M±m	відносного приросту мишей, %
60 кГц	комплекс антигенів УФК	256,6		пацірж мишей			
	≥ 1000±0,0* (УФА)	16,7	134±4,7**	139,7±5,6**	151±6,6**	17±3,1**	94,4
	8,1±0,0* (УФВ)	35	137,7±4,4**	144±3,2**	148,7±6,4**	11±2,3**	61,1
	2,9 ±0,5** (УФС)	160	132±3,5**	137±3,2**	144±2,9*	12±0,6*	66,6
	комплекс антигенів УФК	33,2	133±4,0*	140,3±3,4*	137±3,5**	4±0,6*	22,2
130 кГц	комплекс антигенів УФК	256,6		пацірж мишей			
	≥ 1000±0,0* (УФА)	3,3	130,3±4,1*	150±3,2*	155,7±2,6*	25,3±1,5*	140,5
	420±0,0*	10	134±3,2**	146,7±5,4**	159±3,0*	25±1,7*	138,8
	8,1±0,0* (УФВ)	15,1	139±4,4**	132,3±4,4**	145±4,0**	6±1,2**	33,3
	3,0±0,6** (УФС)	167,7	131±2,1*	137,7±2,4*	142,7±2,3*	11,7±0,7*	65
1,6 мГц	комплекс антигенів УФК	26,1	140,7±3,5*	149±3,8*	154,7±2,9*	14±1,0*	77,8
	комплекс антигенів УФК	415,3		пацірж мишей			
	≥ 1000±0* (УФА)	23,2	133,7±4,1**	141±4,3**	147±3,6**	13,7±1,8*	75,9
	8,1±0* (УФВ)	25	133±4,7**	140,7±3,8**	145±3,2**	12±1,5**	66,6
	2,6±0,02* (УФС)	333,7	133,3±3,8**	140,3±4,5**	145±5,5**	11,7±2,3**	64,8
	коклюшна вакцина	15,3	132±3,6**	143,3±2,2**	149,3±2,3*	17,3±1,3*	96,1
	фізичний розчин	25	133,3±4,6**	140,7±5,0**	150,3±2,6**	17±2,1**	94,4
			139,3±6,4*	145±6,1*	151,3±5,2*	12±1,2*	66,6
			143±5,6*	156,3±5,2*	161±5,1*	18±0,6*	

Примітки. * P<0,01; ** P<0,05



Фото. Дермонекротичні властивості антигенного комплексу, виділеного після дезінтеграції середньочастотним ультразвуком (130 кГц) промислового штаму *Bordetella pertussis* № 267

Препарат із концентрацією 24 мкг загального білка не викликав некротичного пошкодження шкіри мурчаків, тоді як збільшення дози до 36 і 48 мкг білка спричинило некроз у діаметрі 3 мм і 10 мм відповідно.

Враховуючи отримані результати, нами проведено аналогічний експеримент з тим же антигенним комплексом (УФК) і в тих же дозах (24, 36 і 48 мкг за загальним білком), але як біологічний об'єкт використовували кролів. Пауза між дослідями складала два місяці, зазначений препарат зберігався впродовж всього часу в замороженому стані при низьких температурах (-16°C). Результати вивчення дермонекротичних властивостей даного препарату підтвердили попередні дані. Уведення зазначеного комплексу в дозах 36 і 48 мкг загального білка викликало некротичне пошкодження шкіри кролів, що свідчить про наявність дермонекротичного токсину.

Вивчення дермонекротичних властивостей окремих антигенів (УФА та УФВ) із зазначеного ультразвукового комплексу, отриманого в середньочастотному діапазоні, здійснювали в концентраціях 1,6-27 мкг (загального білка). Некротичного пошкодження шкіри тварин у результаті проведеного експерименту не спостерігалось.

При вивченні токсичності в тесті зміни маси мишей антигенного комплексу УФК, отриманого із промислового штаму *Bordetella pertussis* № 475 при застосуванні височастотного чинника, спостерігається загибель вакцинованих мишей протягом перших трьох діб експерименту. Тенденція прояви первинної токсичності в даному випадку зберігається як і для низько- та середньочастотних ультразвукових антигенних комплексів УФК. Уведення очищених антигенів височастотного ультразвукового комплексу (фракції з молекулярними масами ≥ 1000 кДа, 8,1 кДа, 2,6 кДа) показало перевищення показників відносного приросту дослідних тварин більш ніж на 60% за контрольну групу. Отримані дані свідчать про відсутність токсичних субстанцій коклюшного мікроба, оскільки первинної реакції та пізньої токсичності в дослідних тварин не відмічали.

Вивчення дермонекротичних властивостей окремих антигенів (молекулярні маси ≥ 1000 кДа та 8,1 кДа), отриманих із височастотного ультразвукового комплексу, у дозах 2,7 і 27 мкг загального білка показало відсутність некротичного пошкодження в місці введення препарату незважаючи на збільшення необхідної дози.

Провести порівняльну характеристику отриманих результатів з даними літератури не видається можливим. У проаналізованих нами джерелах вивчалися нерозділені антигенні комплекси, тоді як токсичність кожної окремої фракції не визначалась.

Висновки

1. Вивчення реактогенності антигенних комплексів УФК, виділених у різних частотних діапазонах ультразвуку (низькі, середні, високі), показало прояв первинної токсичності, що свідчить про наявність ендотоксину або дермонекротичного токсину.

2. При застосуванні середньочастотного ультразвуку виділено додатковий антиген з молекулярною масою 420 кДа. Даний препарат зменшував масу дослідних тварин та спричиняв загибель мишей, що є показником токсичних властивостей коклюшного мікроба.

3. При вивченні дермонекротичних властивостей комплексу антигенів (УФК), виділеного в результаті середньочастотної дезінтеграції клітин, у дозі 24 мкг загального білка некрозу не відмічалось, тоді як збільшення концентрації до 36 і 48 мкг білка спричинило некротичне пошкодження шкіри тварин у діаметрі 3 і 10 мм відповідно.

4. У результаті фракціонування низькочастотного ультразвукового комплексу виділено препарат із молекулярною масою 2,9 кДа, який викликав зменшення відносного приросту маси мишей після третьої доби експерименту.

Перспективи подальших досліджень. У подальшому планується провести вивчення протективних властивостей отриманих антигенів з метою використання їх для удосконалення вакцинних препаратів та розробки нових імунобіологічних засобів.

Література

1. "Аналітична нормативна документація на кашлюкову суспензію" (ЗАТ «Біолік»). – № 23. – 24.07.2003. – 32 с.
2. World Health Organization, Technical Report Series. – № 800. – 1990.
3. World Health Organization, Technical Report Series. – № 878. – 1998.
4. WHO Working Group meeting on Standardization of Acellular Pertussis Vaccines: potency assay. – 7-9 November 2007.

**ИЗУЧЕНИЕ ТОКСИЧЕСКИХ СВОЙСТВ АНТИГЕНОВ *B. PERTUSSIS*, ПОЛУЧЕННЫХ
В РАЗНЫХ ЧАСТОТНЫХ ДИАПАЗОНАХ УЛЬТРАЗВУКА*****Е.Ю.Исаенко***

Резюме. Изучена токсичность антигенных комплексов и их фракций, полученных из *B.pertussis* с помощью низко-, бредне- и высокочастотного ультразвука. Определены дермонекротические свойства указанных антигенов *B.pertussis*.

Ключевые слова: ультразвук, антигены, *Bordetella pertussis*.

**A STUDY OF THE TOXIC PROPERTIES OF *B. PERTUSSIS* ANTIGENS OBTAINED
IN DIFFERENT FREQUENCY ULTROSOUND RANGES*****O.Yu.Isaienko***

Abstract. The toxicity of antigenic complexes and their fractions obtained from *B. pertussis* by means of low, medium and high ultrasound frequency, have been studied. The dermonectrotic properties of the mentioned *B. pertussis* antigens have been determined.

Key words: ultrasound, antigens, *Bordella pertussis*.

Laboratory of Specific Prophylaxis of Droplet Infections (Kharkiv)
State Institution "Institute of Microbiology and Immunology" named after I.I. Mechnikov of Ukraine's AMS (Kharkiv)

Рецензент – проф. С.Є.Дейнека

Buk. Med. Herald. – 2009. – Vol.13, №3.–P.106-110

Надійшла до редакції 14.05.2009 року

© О.Ю.Исаенко, 2009

**Науково-практична конференція
з міжнародною участю**

**“Інноваційні технології в стоматології
та щелепно-лицьовій хірургії”**

**30-31 жовтня 2009 року
м. Харків**

Адреса оргкомітету:

Харківський національний медичний університет МОЗ України
проспект Леніна, 4
м. Харків, 61022
тел. (057) 704-11-86, 338-20-68