

На правах рукописи

**ЮРИНОВА
ГАЛИНА ВАЛЕРЬЕВНА**

**СОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ
ПРИГОТОВЛЕНИЯ ЭРИТРОЦИТАРНЫХ
ИММУНОДИАГНОСТИКУМОВ ДЛЯ РПГА НА
ОСНОВЕ КЛЕТОЧНЫХ ФРАКЦИЙ
БИФИДОБАКТЕРИЙ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ
СИНТЕТИЧЕСКИХ ПОЛИМЕРОВ**

03.00.23- биотехнология

**Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук**

Улан-Удэ – 2005

Работа выполнена в Иркутском Государственном Университете, институте эпидемиологии и микробиологии Государственного учреждения Научный центр медицинской экологии Восточно-Сибирского научного центра Сибирского отделения РАМН

Научный руководитель: академик РАМН, д-р мед. наук, проф.
В. И. Злобин

Официальные оппоненты: д-р биол. наук, проф. В. К. Войников;
канд. биол. наук А. В. Битуева

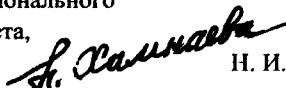
Ведущая организация: Иркутский государственный медицинский
университет

Защита диссертации состоится 21 "июль", 2005 г. в 10 ч на заседании регионального диссертационного совета ДМ 212.039.02 при Восточно-Сибирском государственном технологическом университете по адресу: 670013, Республика Бурятия, г. Улан-Удэ, ул. Ключевская, 40а.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Восточно-Сибирского государственного технологического университета

Автореферат разослан "21" "июль", 2005 г.

Ученый секретарь Регионального
диссертационного совета,
д-р техн. наук, проф.



Н. И. Хамнаева

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

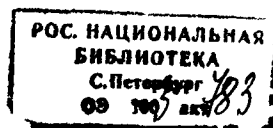
Актуальность проблемы. Последние десятилетия характеризуются возрастающим вниманием исследователей к микроорганизмам, обитающим в организме человека и животных, и их роли в поддержании здоровья и возникновении болезней. Важное значение симбиотической микрофлоры для организма человека к настоящему времени является общепризнанным и базируется на результатах многочисленных исследований (Гончарова Г.И., 1986; Дубинин А.В., Бабин В.Н., Раевский П.М., 1991; Шендеров Б.А., 1998; Перетц Л.Г., 1955). Вместе с тем, молекулярные механизмы кооперативного взаимодействия макроорганизма и населяющих его микроорганизмов, обеспечивающие стабильность кишечной экосистемы, приживление аутохтонной и элиминацию аллохтонной микрофлоры, до настоящего времени окончательно не выяснены.

Постоянство микрофлоры, микробиологический фенотип, присущий каждому человеку, является показателем иммунологической реактивности организма и одним из факторов естественного иммунитета (Пинегин Б.В. с соавт., 1984; Гребнева А.Л., Мягкова А.Н., 1994; Лыкова Е.А. с соавт., 1996; Захарченко М.П., 2003). Показатели специфической реактивности к условно-патогенным и непатогенным бактериям служат важным критерием риска развития устойчивого дисбактериоза. Для определения иммунологической реактивности организма необходимо иметь диагностические тест системы, при выборе которых существенное значение имеет их чувствительность и специфичность, а также и экономический фактор. Поэтому разработка технологических подходов к выделению функционально активных антигенов, создание на их основе искусственных антигенов и применение новых конъюгирующих компонентов на основе синтетических полимеров является актуальной при создании и стандартизации недорогих тест систем, обладающих высокой чувствительностью и специфичностью.

Цель исследования. Изучить физико-химические и иммунологические свойства клеточных фракций бифидобактерий; на основе полученных клеточных фракций сконструировать иммунодиагностикумы для определения антимикробных антител в РПГА с использованием синтетических полимеров.

Задачи исследования:

– изучить влияние антибактериальных (естественных) антител и отваров лекарственных трав на цитoadгезию бифидобактерий *in vitro*;



– выявить оптимальные условия получения и использования комплексов сополимера АК- ВИ с биомолекулами клеточных фракций бифидобактерий;

– сконструировать иммунодиагностикумы на основе антигенов полученных клеточных фракций бифидобактерий для определения антимикробных антител в РПГА с использованием синтетических полимеров в качестве конъюгирующих компонентов.

Научная новизна. Установлено, что естественные антитела против антигенов бифидобактерий могут иметь патогенетическое значение для кишечного микробиоценоза.

Впервые продемонстрирована эффективность использования сополимера акриловой кислоты и винилимидазола (АК- ВИ) в комплексообразовании с биомолекулами клеточных фракций бифидобактерий.

Впервые показано, что полученный в экспериментальных условиях искусственный антиген при вакцинации способен давать притупляющий эффект в существенно более низких дозах, чем при введении тех же компонентов в виде смеси, что создает перспективы его использования в медицинских технологиях для получения высокотитражных сывороток.

Усовершенствована технология получения эритроцитарных иммунодиагностикумов на основе выделенных функционально активных антигенов бифидобактерий с использованием синтетических полимеров в качестве конъюгирующих компонентов для определения уровня иммунореактивности организма. Показано, что сконструированные эритроцитарные иммунодиагностикумы обладают высокой специфичностью, чувствительностью и стабильностью при хранении.

Практическая значимость работы. Разработанные технологические подходы по выделению функционально активных антигенов клеточных фракций бифидобактерий и созданию искусственного антигена позволяют использовать их в биомедицинских технологиях при конструировании эритроцитарных иммунодиагностикумов и получении высокотитражных сывороток. Сравнительные результаты испытаний подтвердили диагностическую эффективность созданных иммунодиагностикумов с использованием синтетических полимеров в качестве конъюгирующих компонентов.

Результаты работы включены в материалы учебных занятий по микробиологии, иммунологии и биотехнологии на биолого- почвенном факультете Иркутского государственного университета. Усовершенствованная технология приготовления эритроцитарных иммунодиагностикумов используется в практической деятельности института эпидемиологии и микробиологии Государственного учреждения Научный центр медицинской экологии Восточно-Сибирского научного центра Сибирского отделения РАМН (акты внедрения приложены к диссертации)

Апробация работы. Результаты исследований были представлены на научной конференции студентов и молодых ученых «Экология Южной Сибири» (Абакан, 2001); научной конференции «Техногенное загрязнение и инфекционная патология» (Иркутск, 2001); VIII Съезде Всероссийского общества эпидемиологов, микробиологов и паразитологов (Москва, 2002); Международной научно-практической конференции «Пробиотические микроорганизмы, современное состояние вопроса и перспективы использования» (Москва, 2002); Всероссийской научно- практической конференции «Развитие физико- химической биологии и биотехнологии на современном этапе» (Иркутск, 2003); Межрегиональной научно- практической конференции «Биология микроорганизмов и их научно- практическое использование» (Иркутск, 2004); Международной конференции «Пробиотики, пребиотики, синбиотики и функциональные продукты питания» (Москва, 2004).

Публикации. По материалам исследования опубликовано 14 печатных работ.

Структура и объем работы. Диссертационная работа изложена на 140 страницах машинописного текста, состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, результатов собственных исследований, их обсуждения, выводов, списка литературы. Работа иллюстрирована 9 рисунками и 15 таблицами. Список литературы включает 250 источников, в том числе 100 зарубежных авторов.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Приведен анализ отечественной и иностранной научной литературы по взаимоотношениям в системе «макроорганизм-микробиота». Проанализировано влияние различных факторов на адгезию микроорганизмов. Описано действие синтетических полимерных адъювантов на иммуногенез. Показана иммуномодулирующая активность комплексов антигенов с синтетическими полимерами. Описаны способы получения диагностических систем на основе эритроцитов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объекты исследований. – Клеточные фракции бифидобактерий (штамм *Bifidobacterium bifidum* 1, полученный из коммерческого препарата *Bifidobacterium siccum*, производства «Ланафарм», г. Москва), полученные методом ультразвуковой дезинтеграции с последующим дифференциальным центрифугированием;

– штамм *Bifidobacterium bifidum* 1., полученный из сухого коммерческого препарата “*Bifidobacterium siccum*”, сер. 0518, выпуска 1998 г., производства ФГУП “Аллерген”, г. Ставрополь;

– синтетические полимеры: сополимер акриловой кислоты и винилимидазола (АК- ВИ), поливинилимидазол (ПВИ), сополимер 1-винил-4,5,6,7-тетрагидроиндола, метакриловой кислоты и метилметакрилата (МАК- ВТГИ), полиметакриловая кислота (ПМАК).

Адгезивный процесс бифидобактерий изучали по методике Брилис В.И. и соавт.(1986).

Количественное определение белка в клеточных фракциях бифидобактерий определяли по методу Лоури (1951).

Белки клеточных фракций анализировали с помощью субъединичного электрофореза в щелочной буферной системе по Лэммли (1970).

Аминокислотный анализ белков клеточных фракций бифидобактерий проводился в Na^+ -цикле на аминокислотном анализаторе ААА-881 (Чехословакия).

Спектральный анализ продуктов взаимодействия биомолекул клеточных фракций с сополимером АК- ВИ проводили на спектрометре Bruker IFS25, ИК- спектры снимали в таблетках с KBr.

Иммунологические исследования были проведены на 12 кроликах породы “Шиншилла” и 42 беспородных мышях самцах.

Определение содержания антител к общим антигенам бифидобактерий и антигенам клеточных фракций проводили в реакции пассивной (непрямой) гемагглютинации (РПГА).

Статистическую обработку данных проводили с использованием пакета программ «Excel» и «Statgrafics». Выводы сделаны при вероятности безошибочного прогноза $P \geq 0,95$.

Схема экспериментальных исследований представлена на рисунке 1.

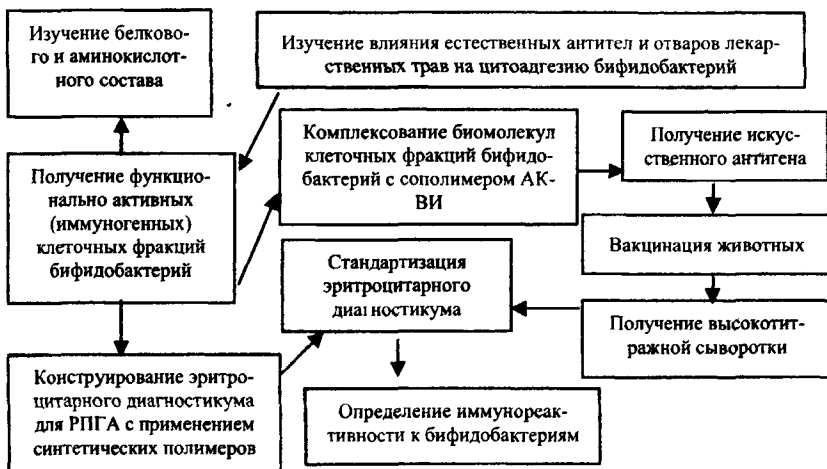


Рис. 1. Схема экспериментальных исследований

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Изучение влияния экзогенных и эндогенных факторов на адгезию бифидобактерий *in vitro*

Изучение влияния естественных антител на цитоадгезию бифидобактерий показало, что как детские, так и взрослые сыворотки с антителами против бифидобактерий проявили антиадгезивный эффект (табл. 1).

Таблица 1

Показатели адгезии бифидобактерий после их преинкубации с сыворотками разных групп населения

Режим экспозиции, мин.	Средний показатель адгезии (СПА)				
	Бифидобактерии + сыворотка детей с отсутствием антител	Бифидобактерии + сыворотка детей с наличием антител	Бифидобактерии + сыворотка взрослых с отсутствием антител	Бифидобактерии + сыворотка взрослых с наличием антител	Контроль (бифидобактерии + физ.р-р)
60	$2,0 \pm 0,14$	$1,155 \pm 0,12$ ($p \leq 0,01$)	$1,225 \pm 0,047$	$0,670 \pm 0,07$ ($p \leq 0,01$)	$1,390 \pm 0,02$

Средние показатели адгезии бифидобактерий в контроле ($1,39 \pm 0,02$) сопоставимы с таковыми в экспериментах с применением сывороток детей ($2,0 \pm 0,14$) и взрослых ($1,225 \pm 0,047$), где антитела против бифидобактерий не обнаруживались. В первом случае СПА бифидобактерий после обработки их сыворотками детей, содержащими антитела против этих микроорганизмов, значимо снизился с $2,0 \pm 0,14$ до $1,155 \pm 0,12$ (снижение адгезии на 42,3%). Во втором варианте СПА бифидобактерий после обработки их сыворотками взрослых также достоверно понизился с $1,225 \pm 0,047$ до $0,670 \pm 0,07$ (снижение адгезии на 45,3%).

Использование отвара кашкары оказывало выраженную ингибицию адгезии бифидобактерий (от 12% до 23% по отношению к контролю), это позволяет заключить, что данный растительный препарат блокирует рецепторы эритроцитов и адгезины бактерий. Таким образом, блокировка бактериальной адгезии при длительном употреблении лекарственных

бактериальной адгезии при длительном употреблении лекарственных растений, которые часто рекомендуются практическими врачами при кишечных энтероколитах (Минаева В.Г., 1991) является одним из механизмов, способствующих снижению колонизационной резистентности организма.

Получение функционально активных (иммуногенных) клеточных фракций и изучение их белкового и аминокислотного состава

При выборе способа выделения клеточных фракций исходили из того, что антигены бифидобактерий должны быть в нативном состоянии. В связи с этим, были отработаны режимы получения функционально активных клеточных фракций бифидобактерий (рис.2).

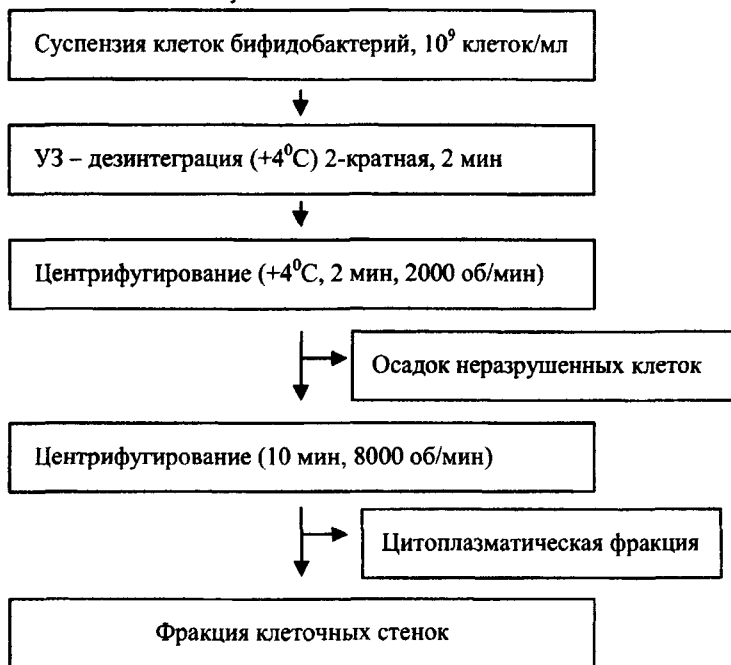


Рис. 2. Схема получения клеточных фракций бифидобактерий

Определение серологической активности клеточных фракций бифидобактерий с помощью РПГА показало, что они обладают функциональной активностью (иммуногенностью) (табл. 2). Более высокий титр антител в РПГА цитоплазматической фракции можно связать с более высокой дозой антигена, рассчитанной на белок (0,535 мг/мл).

Таблица 2

Иммуногенность клеточных фракций бифидобактерий

Исследуемый объект, доза (мг) на 1 животное	Титр антител					
	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1: 64
ФКС , 0,38	++++	++++	++++	++++	=	=
ЦПФ, 1,24	++++	++++	++++	++++	++++	=

* Представлены средние данные трех параллелей, полученные в одном опыте; «++++» – полная агглютинация, «=» – отсутствие агглютинации

Электрофоретическое разделение белков клеточных фракций бифидобактерий показало, что фракция клеточных стенок содержит до 30 отдельных белковых субъединиц с молекулярными массами от 44,2 кДа до 125 кДа, цитоплазматическая фракция- до 17 субъединиц с молекулярной массой от 44,2 кДа до 85 кДа (рис. 3).

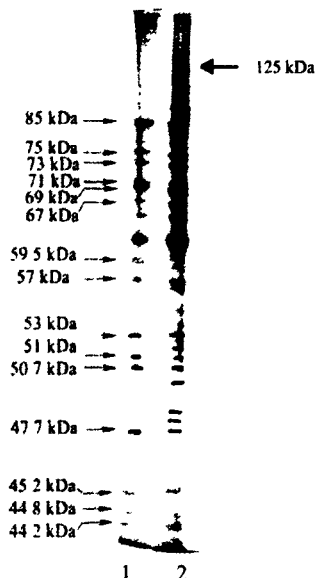


Рис. 3. DDS-Na электрофорез клеточных фракций бифидобактерий по Лэммли. 1. ЦПФ, 2. ФКС

Аминокислотный анализ белков клеточных фракций показал, что четыре аминокислоты (аланин, аспарагиновая кислота, глутаминовая кислота, глицин) составляют более 50% от общего аминокислотного состава белков клеточной стенки бифидобактерий; пять аминокислот (аланин, пролин, аспарагиновая, глутаминовая кислота, лизин) составляют более 60% от общего аминокислотного состава белков цитоплазматической фракции бифидобактерий (табл.3).

Таблица 3

Аминокислотный состав белков клеточных фракций бифидобактерий

Аминокислота	Молярные проценты	
	Фракция клеточных стенок	Цитоплазматическая фракция
Аланин	17,7	9,6
Валин	6,86	8,3
Лейцин	7,33	6,0
Изолейцин	4,99	4,0
Фенилаланин	1,5	2,1
Метионин	1,1	0,8
Пролин	4,55	9,2
Тирозин	0,17	1,4
Серин	6,46	5,3
Треонин	5,29	4,0
Глицин	10,27	5,1
Аспарагиновая кислота	12,99	8,0
Глутаминовая кислота	16,2	21,2
Аргинин	1,01	1,9
Лизин	2,9	12,2
Гистидин	0,68	0,9
Σ	100	100

Получение комплексов биомолекул клеточных фракций бифидобактерий с сополимером АК-ВИ и изучение их иммуногенности

В результате изучения взаимодействия сополимера акриловой кислоты и винилимидазола с биомолекулами клеточных фракций бифидобактерий было показано, что при подкислении среды наблюдалось образование осадков (табл. 4).

Таблица 4

Условия образования осадков биологических молекул клеточных фракций бифидобактерий с сополимером АК-ВИ

Фракция бифидобактерий, pH	Количество 0,1 М HCl для образования осадка, мл	pH выпадения осадка	Масса осадка, мг
ФКС, 7,7	15,35	5,43	10,85
ФКС, 7,7	15,40	4,43	8,18
ЦПФ, 7,6	14,60	5,34	18,7
ЦПФ, 7,6	15,95	3,67	8,95

Данные спектроскопии показали, что осадок, образованный при pH 5,43 содержит как синтетический полимер, так и биомолекулы ФКС (спектр 5, рис. 4).

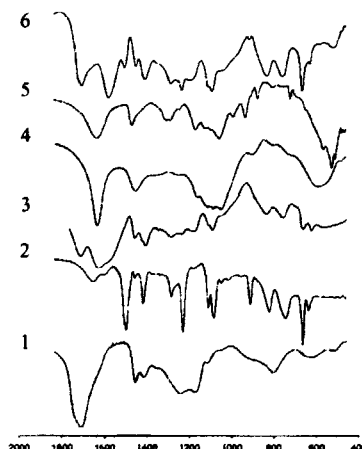


Рис. 4. ИК- спектры полиакриловой кислоты (1), поли-1-винилимидазола (2), сополимера АК-ВИ (3), лиофилизированной ФКС (4), осадка при pH 5,43 (5), осадка при pH 4,43 (6).

В спектре сохраняются основные полосы поглощения звеньев ВИ (1110, 1080, 827 и 744 см^{-1}) и полосы поглощения биомолекул ФКС (1630, 1465, 1040–1150). Осадок, образующийся при pH 4,43 (спектр 6) представлен сополимером (рис. 4). Результаты, полученные для ЦПФ указывают на отсутствие содержания сополимера в осадке, образованного при pH 5,34 (спектр 5, рис. 5). В спектре присутствуют только полосы погло-

щения биомолекул ЦПФ (1645, 1545, 1050, 935, 510). Осадок, полученный при pH 3,67 (спектр 6, рис.5) содержит как сополимер, так и биомолекулы ЦПФ. В спектре сохраняются полосы поглощения сополимера (1107, 1985, 1230, 1400, 1700, 660, 622) и полоса поглощения биомолекул ЦПФ (1638).

Анализ условий усиливающего действия сополимера АК-ВИ на процесс вторичного иммунного ответа показал тенденцию к повышению иммуногенности антигенов ФКС и при совместном их введении с сополимером АК- ВИ и в составе комплекса (табл. 5). Это можно объяснить образованием множества водородных и ионных связей между биомолекулами ФКС и молекулами сополимера, придающих прочность комплексам, образованным в экспериментальных условиях и в физиологических условиях организма. Причем титр 1:32 в случае комплексообразования *in vitro* можно получить используя дозу искусственного антигена (ФКС-сополимер) в 8 раз меньшую, чем при введении смеси антигенов ФКС с сополимером в одном шприце. Это может, свидетельствовать о фокусировке антигеном действия адьюванта (сополимер АК- ВИ) на предшественниках антигенспецифических клеток памяти.

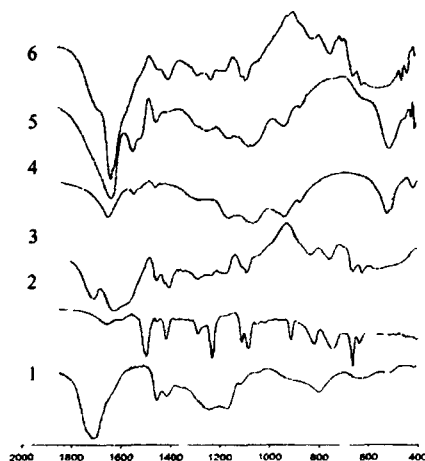


Рис. 5. ИК- спектры полиакриловой кислоты (1), поли-1-винилимидазола (2), сополимера АК-ВИ (3), лиофилизированной ЦПФ (4), осадка при pH 5,34 (5), осадка при pH 3,67 (6).

Таблица 5

Оценка иммуногенности комплексов антигенов клеточных фракций бифидобактерий с сополимером АК- ВИ (соотношение звеньев 54:46)

Исследуемый объект	Доза, мг	Способ введения	Титр антител
ФКС-(АК-ВИ) осадок при pH 5,43	0,54	Внутрибрюшинно и в подушечки лап в виде комплекса	1:32
ФКС + (АК-ВИ)	4,38	Внутрибрюшинно и в подушечки лап смесь в одном шприце	1:32
ФКС	0,38	Внутрибрюшинно и в подушечки лап	1:16

* Представлены средние данные трех параллелей, полученные в одном опыте; «++++»- полная агглютинация; «-»- отсутствие агглютинации; ФКС-(АК-ВИ)- комплекс антигенов фракции клеточных стенок с сополимером АК-ВИ; ФКС+(АК-ВИ)- смесь антигенов фракции клеточных стенок с сополимером АК-ВИ.

Показана низкая иммуногенность комплекса антигенов ЦПФ с сополимером АК- ВИ, полученного *in vitro* при pH 3,67. Это связано с его неустойчивостью в физиологической среде, в результате чего часть связанного белкового антигена может теряться, поэтому использование искусственного антигена (ЦПФ- АК-ВИ) не перспективно.

Таким образом, устойчивость и иммуногенность комплекса антигенов ФКС с сополимером АК- ВИ, полученного *in vitro* при pH 5,43 позволяет использовать его при конструировании эритроцитарных иммунодиагностикумов и получении высокотитражных сывороток.

Конструирование и оценка активности эритроцитарных иммунодиагностикумов для РПГА на основе клеточных фракций бифидобактерий с применением синтетических полимеров

Изучение эффективности антигенной сенсибилизации эритроцитов барана с помощью синтетических полимеров: поливинилимидазола (ПВИ), сополимера 1-винил-4,5,6,7-тетрагидроиндола, метакриловой кислоты и метилметакрилата (МАК- ВТГИ), полиметакриловой кислоты (ПМАК) и гидрохинона показало, что синтетические полимеры более активно сенсибилизируют эритроциты антигенами, чем гидрохинон и соответственно, эритроцитарные иммунодиагностикумы на их основе определяют специфические антитела в РПГА в более высоких титрах (1:64-1:128) (табл. 6).

Сополимер МАК-ВТГИ показал высокую активность при снижении концентрации полимера в 20 раз (0,8мг/мл и 0,04мг/мл), что можно связать с его химической структурой. Введение некоторого количества гидрофобных групп в цепь полимера существенно повышает стабильность образующихся на его основе интерполимерных комплексов. В случае применения ПВИ в качестве связующего агента при концентрациях 0,04-0,08мг/мл наблюдалась спонтанная агглютинация эритроцитов при замене иммунной сыворотки физиологическим раствором. Понижение концентрации ПВИ до 0,005-0,01мг/мл позволило устранить этот эффект при сохранении высокой активности полимера в качестве связующего агента.

Таблица 6

Чувствительность эритроцитарных антигенных диагностикумов в зависимости от вида конъюгирующего компонента

Связывающий компонент, концентрация	Титры антибактериальных антител в РПГА							
	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256
Сополимер МАК-ВТГИ (1000 кДа), 0,8мг/мл	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	+/-
Сополимер МАК-ВТГИ (1000 кДа), 0,04мг/мл	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	-
ПВИ (70 кДа), 0,005мг/мл	++++	++++	++++	-	-	-	-	-
ПВИ (70 кДа), 0,01мг/мл	++++	++++	++++	++++	++++	++++	+/-	+/-
Гидрохинон, 0,43% раствор	++++	++++	+/-	-	-	-	-	-

«-»- отсутствие агглютинации; «+/-»- реакция слабо положительная

Диагностикум, приготовленный с конъюгирующим компонентом ПВИ при концентрации 0,01мг/мл, сохранял высокую активность, и титр антибактериальных антител к антигенам бифидобактерий в РПГА составил 1:32- 1:64. Проведенная сравнительная характеристика сконструиро-

ванных диагностических препаратов, приготовленных на основе антигенов двух клеточных фракций бифидобактерий с использованием в качестве конъюгирующего компонента сополимера АК- ВИ показала, что эритроцитарный иммунодиагностикум на основе антигенов фракции клеточных стенок определил высокие титры антител (1:32) в большем количестве сывороток (46%) по сравнению с эритроцитарным иммунодиагностикумом на основе антигенов цитоплазматической фракции, который определил те же титры в 14% сывороток. Титры антител 1:8- 1:16 первый диагностикум выявил в 54% сывороток, второй- в 74% сывороток (рис. 6).

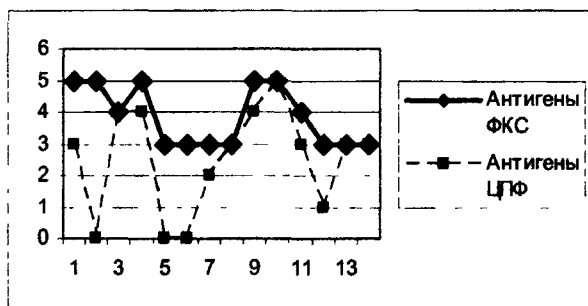


Рис. 6. Сравнительная характеристика диагностикумов на основе антигенов клеточных фракций бифидобактерий с применением сополимера акриловой кислоты и винилимидазола (АК- ВИ) (0,8 мг/мл)

ЭД на основе цитоплазматической фракции в трех случаях показал отрицательные результаты (отсутствие специфических антител), хотя ЭД на основе антигенов ФКС зафиксировал наличие антител, что характеризует его как более чувствительный. Сравнительная характеристика сконструированных иммунодиагностикумов на основе трех типов антигенов бифидобактерий показала, что эритроцитарный иммунодиагностикум на основе антигенов клеточной стенки бифидобактерий определил высокие титры антител (1:16- 1:64) в 97% сывороток, эритроцитарный иммунодиагностикум на основе антигенов цитоплазматической фракции- в 15 % сывороток (1:16), третий ЭД на основе общих антигенов бифидобактерий определяет эти же титры антител в 56% сывороток (рис.7).

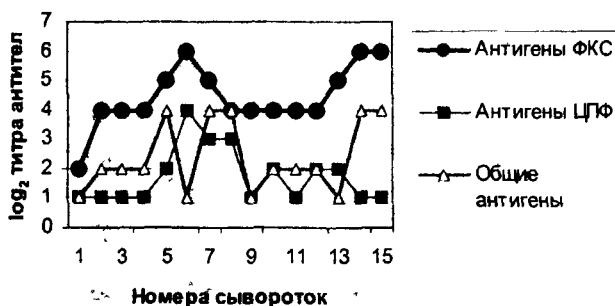


Рис. 7. Сравнительная характеристика диагностикумов на основе антигенов клеточных фракций и общих антигенов бифидобактерий с применением сополимера АК-ВИ

Таким образом, при конструировании эритроцитарных диагностикумов по определению специфических антител к бифидобактериям целесообразно сенсibilизировать эритроциты антигенами клеточных стенок или целыми клетками бифидобактерий. Однако использование в РПГА диагностикума на основе антигенов фракции клеточных стенок бифидобактерий позволяет повысить чувствительность к исследуемым антителам в среднем в 6 раз по сравнению с диагностикумом, приготовленным с использованием целых клеток бифидобактерий.

Испытание сконструированного эритроцитарного иммунодиагностикума на основе антигенов фракции клеточных стенок с применением сополимера АК-ВИ в качестве конъюгирующего компонента для определения иммунореактивности разных групп населения показало, что содержание антибактериальных антител в сыворотке крови различных групп населения (от рождения до 14 лет и от 25 до 35 лет) регистрируется в низких концентрациях (\log_2 титра 1-3) (рис. 8), что согласуется с данными литературы об иммунологической толерантности к представителям индигенной микрофлоры.



Рис. 8. Показатели титра антибактериальных антител (в \log_2) к антигенам бифидобактерий. 1. Новорожденные, 2. Дети (1- 5 лет), 3. Дети (6-8 лет), 4. Дети (9- 14 лет), 5. Взрослые (25- 35 лет)

Возможность широкого применения РПГА с сенсibilизированными эритроцитами в значительной мере определяется стабильностью эритроцитарного диагностикума, которая обеспечивается прочностью связи между носителем и сенсибином, отсутствием спонтанной агглютинации носителя. Измерение чувствительности РПГА с диагностикумами разных сроков хранения показало, что жидкие эритроцитарные иммунодиагностикумы, приготовленные с использованием синтетических полимеров, сохраняют свою активность в течение 2-х лет (срок наблюдения) при $t=3-6$ градусов (таб.7). Эритроцитарные диагностикумы, приготовленные с использованием гидрохинона сохраняют свою активность в течение 3-5 месяцев при $t=3-6$ градусов. При более длительном хранении наблюдаются явления спонтанной агглютинации сенсibilизированных эритроцитов.

Таблица 7

Активность эритроцитарных диагностикумов разных сроков хранения

Сроки хранения, мес.	1	3	6	12	18	24
Log ₂ титра антител	5	5	5	5	5	5

ВЫВОДЫ

1. Антибактериальные (естественные) антитела в сыворотках людей, ингибируя цитоадгезию (на 19-45%) могут иметь патогенетическое значение для кишечного микробиоценоза. Отвар кашкары снижает адгезивную активность бифидобактерий (на 12- 23%), что способствующих снижению колонизационной резистентности организма

2. Клеточные фракции бифидобактерий, полученные с помощью разработанного метода, обладают функциональной активностью (иммуногенностью).

3. Иммуногенность фракции клеточных стенок обеспечивают белки с молекулярными массами от 44,2 кДа до 125 кДа, цитоплазматической фракции- белки с молекулярными массами от 44,2 кДа до 85 кДа

4. Четыре аминокислоты (аланин, аспарагиновая кислота, глутаминовая кислота, глицин) представляют более 50 % от общего аминокислотного состава белков клеточной стенки бифидобактерий; пять аминокислот (аланин, пролин, аспарагиновая, глутаминовая кислота, лизин) составляют более 60 % от общего аминокислотного состава белков цитоплазматической фракции бифидобактерий.

5. Комплекс антигенов клеточной стенки бифидобактерий с сополимером АК- ВИ, полученный при pH 5,43 позволяет при иммунизации использовать дозу антигена в 8 раз меньшую, чем при введении смеси антигенов ФКС с сополимером в одном шприце, что доказывает перспективность его использования при получении высокотитражных сывороток. Устойчивость полученного комплекса позволяет использовать антигены фракции клеточных стенок и сополимер АК- ВИ для получения стабильных эритроцитарных иммунодиагностикумов.

6. Полученный при pH 3,67 комплекс антигенов цитоплазматической фракции с сополимером АК-ВИ показал низкую иммуногенность (титр 1:8), что является доказательством неперспективности использования антигенов этой фракции в комплексообразовании с сополимером АК-ВИ в плане получения искусственных антигенов и высокотитражных сывороток.

7. Сконструированные эритроцитарные иммунодиагностикумы на основе антигенов бифидобактерий с использованием синтетических полимеров в качестве конъюгирующих компонентов обладают высокой активностью. Специфичность подтверждается взаимодействием эритроцитарного иммунодиагностикума с гомологичными сыворотками, чувствительность и стабильность выражается в высоких титрах (1:16- 1:64).

Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. Юринова Г.В. Адгезивность бифидобактерий– как фактор, определяющий эубиоз кишечника/ Юринова Г.В., Попкова С.М., Злобин В.И. // Экология Южной Сибири: мат-лы Южно-сибирской междунар. науч. конф. студентов и мол. уч. – Абакан, ноябрь, 2001 г. – Т.2. – С.170–171.
2. Юринова Г.В. Роль адгезии бактерий в колонизации слизистых поверхностей организма / Юринова Г.В., Попкова С.М., Злобин В.И. // Бюлл. СО РАМН. – 2001. – № 3–4. – С.21–26.
3. Антиадгезивный эффект антител против бифидобактерий в системе in vitro/ Попкова С.М., Кичигина Е.Л., Лещук С.И., Юринова Г.В. // Аллергология, астма и иммунология. – 2001. – № 9. – С.15–17.
4. Попкова С.М. Особенности формирования кишечного микробиоценоза у детей в современных условиях/ Попкова С.М., Кичигина Е.Л., Юринова Г.В. и др. // Бюллетень ВСНЦ СО РАМН.– Иркутск, 2001. – №4(18). – С. 72–74.
5. Попкова С.М. Влияние некоторых экзогенных и эндогенных факторов на адгезию бифидобактерий/ Попкова С.М., Кичигина Е.Л., Юринова Г.В. // Журнал микробиол. – 2002. – №6. – С.15–21.
6. Попкова С.М. О некоторых факторах, влияющих на адгезию бифидобактерий/ Попкова С.М., Кичигина Е.Л., Юринова Г.В.и др. // Материалы VIII Съезда Всерос. общ-ва эпидемиологов, микробиологов и паразитологов. – М., 2002. – С.228–229.
7. К вопросу о роли естественных антител в формировании кишечного дисбактериоза/ Попкова С.М., Лещук С.И., Кичигина Е.Л., Юринова Г.В., Сердюк Л.В.// Пробиотические микроорганизмы – современное состояние вопроса и перспективы использования: мат-лы междунардн. науч.-практ. конф., май 2002 г. – М., 2002. – С.33.
8. Выделение клеточных стенок бифидобактерий/ Юринова Г.В., Попкова С.М., Анненков В.В. и др. // Бюлл. ВСНЦ.– 2003.– №7.– С.37–39.
9. Изучение иммуногенности некоторых клеточных фракций бифидобактерий/ Юринова Г.В., Лещук С.И., Попкова С.М и др.// Бюлл. ВСНЦ. – 2003. – №7. – С.39–41.
10. Новые полимерные системы для иммунологии: адъюванты, гидрогели, функционализированные покрытия/ Анненков В.В., Лещук С.И., Юринова Г.В.и др. // Фундаментальные науки– медицине: Материалы конф., 10– 11 декабря, 2003 г.– М., 2003.– С.85–86.

биол.–2004.– № 2.–С.70–74.

12. Юринова Г.В. Выделение клеточных фракций бифидобактерий и изучение их иммуногенности/ Юринова Г.В., Попкова С.М, Анненков В.В. и др. // Пробиотики, пребиотики, синбиотики и функциональные продукты питания: Материалы Межд. конф., июнь, 2004 г.- М.,2004.– С.38–39.

13. Юринова Г.В. Использование неприродных полиэлектролитов в иммунотехнологии/ Юринова Г.В., Анненков В.В , Даниловцева Е.Н. и др. // Биология микроорганизмов и их научно– практическое использование: Материалы Межрегиональной научно-практ. конф., Иркутск, октябрь, 2004 г. – С.99–101.

14. Анненков В.В. Современные подходы к конструированию препаратов в иммунотехнологии/ Анненков В.В., Даниловцева Е.Н., Юринова Г.В. и др. // Бюллетень ВСНЦ РАМН. – 2004. – №9. – С.50–54.

Список основных сокращений

ФКС – фракция клеточных стенок

ЦПФ – цитоплазматическая фракция

СПА – средний показатель адгезии

ЭД – эритроцитарный иммунодиагностикум

РПГА – реакция пассивной(непрямой) гемагглютинации

АК- ВИ – сополимер акриловой кислоты и винилимидазола, ММ= 1750 кДа

ПВИ – поливинилимидазол, ММ= 70 кДа

МАК- ВТГИ – сополимер 1-винил-4,5,6,7-тетрагидроиндола, метакриловой кислоты и метилметакрилата, ММ=1000 кДа

ПМАК – полиметакриловая кислота, ММ=1000 кДа



Подписано в печать 20.10.05. Формат 60х84 1/16.
Печать трафаретная. Усл. печ. л. 1,0. Тираж 100 экз. Заказ 81.

РЕДАКЦИОННО-ИЗДАТЕЛЬСКИЙ ОТДЕЛ
Иркутского государственного университета
664003, Иркутск, бульвар Гагарина, 36; тел. (3952) 24–14–36

[-

[-

4

4

№ 19573

РНБ Русский фонд

2006-4

20733