Міністерство охорони здоров'я України
Харківський науково-дослідний інститут мікробіології
та імунології ім. І.І. Мечнікова

ГРУЗЕВСЬКИЙ ОЛЕКСАНДР АНАТОЛІЙОВИЧ

УДК 579. 61: 616-078: 579. 873. 21

Вивчення видоспецифічності поверхневих компонентів *Mycobacterium kansasii*

03.00.07 – мікробіологія

АВТОРЕФЕРАТ
дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата медичних наук

Харків - 2000

Дисертацією є рукопис.

Робота виконана в Одеському державному медичному університеті Міністерства охорони здоров'я України

Науковий керівник: доктор медичних наук, доцент **Протченко Павло Захарович**, завідувач кафедри мікробіології, вірусології та імунології Одеського державного медичного університету

Офіційні опоненти:

доктор медичних наук, професор **Мінухін Валерій Володимирович**, кафедра мікробіології, вірусології та імунології Харківського державного медичного університету МОЗ України.

завідувач кафедри клінічної імунології, алергології Буковинської державної медичної академії МОЗ України, доктор медичних наук, професор **Сидорчук Ігор Йосипович.**

Провідна установа: Київський науково-дослідний інститут епідеміології та інфекційних хвороб ім. Л.В. Громашевського МОЗ України

Захист дисертації відбудеться "____" _____200__ р. о ____ годині на засіданні спеціалізованої Вченої Ради Д.64.618.01 при Харківському науково-дослідному інституті мікробіології та імунології ім. І.І. Мечникова (м. Харків, вул. Пушкінська, 14)

З дисертацією можна ознайомитись у бібліотеці Харківського науково-дослідного інституту мікробіології та імунології ім. І.І. Мечникова (м. Харків, вул. Пушкінська, 14)

Автореферат розісланий "____" _____200___ р.

Вчений секретар спеціалізованої Вченої Ради,
кандидат медичних наук Кучма І.Ю.

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. Захворювання, що спричинені мікобактеріями, у теперішній час не лише зберігають свою актуальність, але й мають тенденцію до неухильного поширення (Мельник В.М., 1997, Липкан Г.Н., 1999, Akita Y., et al., 1999). Такий стан притаманний різним країнам по усьому світу, не виключаючи й економічно високорозвинені країни (Horsburg C.R., 1991, Selik et al., 1987). Україна також не є винятком. Туберкульоз в Україні, на думку багатьох спеціалістів, являє собою національну небезпеку (Мельник В.М., 1997, Пухлик Б.М., 1999, Фещенко Ю.І., 2000), оскільки рівень захворюваності неухильно зростає та може вийти з-під контролю. У період з 1990 по 1999 рік показник захворюваності на туберкульоз зріс на 68,8 %, смертність від туберкульозу зросла за цей же період на 146 % (Липкан Г.Н., 1999, Фещенко Ю.І., 2000). З 1995 року в нашій країні офіційно оголошено про епідемію туберкульозу (Фещенко Ю.І., 2000).

Таке погіршення епідеміологічної ситуації по туберкульозу обумовлене, зокрема зниженням імунобіологічної резистентності організму людини у сучасних умовах. Цьому сприяють імунодефіцитні стани первинного та вторинного походження. Цьому ж сприяє й погіршення екологічної рівноваги, що призводить до суттєвих негативних змін у резистентності людини.

На тлі зростання захворюваності на туберкульоз усе більшого значення по усьому світові набувають захворювання, спричинені атиповими мікобактеріями (Murray C.J.L., et al., 1990, Raviglione M.C., et al., 1995, Sherer R., et al., 1986). В Україні з 1986 року спотерігається поступове зростання захворюваності на мікобактеріози, причому у 1995 році 3,1 % випадків захворювань мікобактеріальної етіології склали захвоювання, спричинені атиповими мікобактеріями (Сибірна Р.І. та співавт., 1996). Значення атипових мікобактерій як етіологічних факторів захворюваності людини поглиблюється їх здатністю бути збудниками опортуністичних інфекцій при СНІД та інших імунодефіцитних станах (Бібергаль Е.А., 1991, Олисаев В.Б. и соавт., 1992, Seldenrijk C.A., et al., 1990, McGeady S.J., et al., 1981).

Фотохромогенні мікобактерії досить часто виявляються збудниками мікобактеріозів – частота їх виділення коливається від 2 % до 50 % усіх мікобактеріозів, причому мова йде майже виключно про M. kansasii (Рибка Л.Н. та співавт., 1981, Kubin M., et al., 1987). Враховуючи здатність до тривалого виживання цього мікроорганізму на об'єктах зовнішнього середовища та у воді, нерідко значний ступінь інфікування сільськогосподарских тварин та різноманіття шляхів проникнення до організму людини, можна сказати що M. kansasii має у теперішній час велике епідеміологічне значення (Akita Y., et al., 1999, Dillon J., et al., 1990, Kaustova J.,et al., 1981).

Слід відзначити, що хоча клінічна картина мікобактеріозів, які спричинені M. kansasii схожа з клінічною картиною туберкульозу відповідної локалізації, є й суттєві відмінності (Kubin

M., et al., 1987, Sriyabhaya N., et al., 1981), що потребує міжвидової диференціації мікобактерій. Крім того, лікування захворювань, спричинених різними видами мікобактерій також часто вимагає встановлення біологічного виду збудника (Ewig S., et al., 1990, Tsukamura M., et al., 1989).

Можливі два основних підходи до розв'язання цього завдання. По-перше, можна було б обмежитися диференціацією туберкульозних мікобактерій від атипових, без встановлення виду останніх. По-друге, можливо встановлювати окремо вид кожного збудника. Другий підхід більше відповідає потребам медичної, епідеміологічної та епізоотологічної практики.

До теперішнього часу встановлення виду збудника мікобактеріозу базується, головним чином, на бактеріологічному методі дослідження. Але його тривалість, трудомісткість та значні витрати примушують вести пошук інших методів міжвидової диференціації. Значний прогрес у цьому напрямку досягнутий завдяки застосуванню ПЛР, але й цей метод вимагає складного устаткування, підготовленого персоналу та реактивів (Abed Y., et al., 1995, Barclay R., et al., 1992). Крім того, він також не може розв'язати усых проблем, пов'язаних з протіканням інфекційного процесу, діагностикою та лікуванням (Zimmerman D.R., et al., 1997).

Особливу увагу дослідників привертають методи виявлення видоспецифічних компонентів мікобактерій, зокрема, серологічні методи. Це зумовлено тим, що при простоті виконання та невеликій вартості такі методи спроможні забезпечити достатню чутливість та специфічність (Літвинов В.И., 1990, Krest'anpol M., et al., 1993). Однак пошук видоспецифічних компонентів значно ускладнений високою мірою антигенної спорідненості між різними речовинами, що можуть бути одержані з клітин. Водночас спостерігається досить велика кількість антигенів мікобактерій, що також утруднює пошук серед них видоспецифічних.

Найбільше значення може мати знаходження видоспецифічних компонентів серед поверхневих структур бактеріальної клітини, оскільки саме вони першими стикаються з імунною системою організму, до них, у першу чергу, формується імунна відповідь, що відкриває перспективу для своєчасної, високоспецифічної диагностики та визначає напрямок наших досліджень.

Зв'язок роботи з науковими програмами, темами. Дисертаційна робота є фрагментом планової наукової роботи кафедри мікробіології, вірусології та імунології Одеського державного медичного університету № 0199U002025 "Вивчення видоспецифічних протеїнмістячих поверхневих компонентів мікобактерій з метою створення диагностичної тест-системи". Окремі частини дисертаційної роботи були фрагментами планових наукових робіт Одеського інституту клінічної біохімії та санітарії тварин УААН № 01.01.02 "Ідентифікувати, виділити та вивчити специфічні детермінанти мікобактерій туберкульозу" та № 01.06.2 "Вивчити антигенну структуру атипових мікобактерій з застосуванням ІФА-методів та виділити видоспецифічні антигени з метою розробки антигенних діагностикумів".

Мета і завдання дослідження. Мета роботи – виділити поверхневі компоненти M. kansasii та вивчити наявність серед них видоспецифічних антигенів.

Для досягнення мети були поставлені завдання:

1. Розробити метод одержання поверхневих компонентів M. kansasii шляхом екстрагування бактерійної маси у неденатуруючих умовах.

2. Провести фракціонування екстрактів M. kansasii для виділення компонентів з антигенними властивостями.

3. Одержати імунні сироватки до екстрактів M. kansasii шляхом імунізації кролів та дослідити антигенну структуру нативних і фракціонованих екстрактів M. kansasii.

4. Провести порівняльний аналіз антигенної структури екстрактів M. kansasii та представників інших груп мікобактерій.

5. Провести оцінку видоспецифічності виділеного компоненту при дослідженні екстрактів M. kansasii та інших видів мікобактерій.

Наукова новизна отриманих результатів. Уперше обгрунтовано можливість виділення поверхневих компонентів M. kansasii у неденатуруючихї умовах без суттєвого руйнування мікробних клітин. Серед отриманих компонентів встановлено наявність видоспецифічних антигенів, що можуть бути використані для індикації та міжвидової диференціації M. kansasii.

Практичне значення роботи: на базі виділених видоспецифічних компонентів M. kansasii є можливою розробка діагностикума для швидкої та якісної ідентифікації мікобактерій в експерименті та клініці. Одержані результати вказують на перспективність подальших досліджень складу поверхневих компонентів мікобактерій з метою удосконалення диференційної диагностики мікобактеріозів.

Особистий внесок здобувача. Автором особисто був здійснений патентно-інформаційний пошук, у тому числі з застосуванням електронних засобів, визначені мета і завдання дослідження, методичні підходи, опрацьовані моделі, згідно з якими особисто виконані експериментальні дослідження. Проведено оформлення одержаних результатів у вигляді таблиць і графіків, зроблений їх аналіз, сформульовані висновки роботи. Автором розроблено метод одержання поверхневих компонентів M. kansasii у м'яких умовах з послідовним застосуванням детергентів різної хімічної природи та без помітного руйнування бактеріальних клітин. Відпрацьовані умови розділення екстрактів поверхневих протеїнів на окремі фракції (спільно з Філіповським О.В.), проведено аналіз одержаних фракцій з точки зору їх хімічного складу та антигенної специфічності. Дослідження, що їх було виконано, дозволили виявити компонент M. kansasii, який на цьому етапі можна вважати видоспецифічним. Автором розроблені умови виділення видоспецифічного компонента з ектракта поверхневих компонентів M. kansasii. Усі положення та

висновки дисертації належать авторові. Автором написано особисто, або у співавторстві з д.мед.н. Протченко П.З., к.мед.н. Созіновим В.О., Александровою Л.Н., Філіповським О.В. усі друковані матеріали, що мають відношення до теми роботи.

Апробація роботи і публікації за темою дисертації. Результати роботи висвітлено у 9 наукових роботах, у тому числі у 6 журнальних статтях, з яких 1 – в іноземному журналі, 1 – в збірнику наукових праць.

Результати роботи були представлені у матеріалах конференцій:

XIII з'їзді Українського наукового товариства мікробіологів, епідеміологів та паразитологів ім. Д.К. Заболотного (Київ – Вінниця, 1996);

Науково – практичній конференції молодих вчених та студентів, присвяченої IV конгресу СФУЛТ (Одеса, 1996);

Конференції "Актуальні проблеми мікробіології, вірусології та імунології" (Харків, 1998);

Пленуму Українського наукового товариства мікробіологів, епідеміологів та паразитологів ім. Д.К. Заболотного "Наукові та практичні аспекти боротьби з інфекціями в Україні на межі сторіч" (Одеса, 2000).

Обсяг і структура дисертації. Робота написана на 143 сторінках комп'ютерного тексту та складається з вступу, розділів, які влючають огляд літератури, опис матеріалів і методів досліджень, результати власних досліджень, заключення, висновки. Список літератури включає 211 джерел вітчизняного та зарубіжного походження. Матеріали дисертації ілюстровано 12 таблицями, 24 малюнками.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

У роботі використовували наступні методи: бактеріологічні – посів та накопичення бактеріальної маси M. kansasii; фізико-хімічні – екстрагування компонентів мікобактерій, електрофоретичне фракціонування, знесолювання шляхом гель-хроматографії, іонообмінна хроматографія для виділення окремих компонентів, спектрофотометрія, визначення білку за Lowry та Bradford; імунологічні - імунізація лабораторних тварин для отримання імунних сироваток, реакція преципитації у гелі, імуноелектрофорез.

Експерименти проводили з штамами M. kansasii, M. bovis, M. avium-intracellulare, M. scrofulaceum, M. smegmatis, M. fortuitum, M. phlei. Усі штами були надані Одеським інститутом клінічної біохімії та санітарії тварин УААН. Мікобактерії вирощували та зберігали на плотному живільному середовищі Гельберга, а накопичували бактеріальну масу на синтетичному середовищі Сотона.

Для підтвердження видової належності отриманих штамів застосовували бактеріологічні та біохімічні тести: ніациновий, зріст на середовищі з саліцилатом натрію, швидкість зростання на

плотних поживних середовищах, утворення пігменту, розщеплення сахарів, гідроліз твіну-80, редукція нітратів, зріст у присутності різних хімічних реагентів.

Екстрагування знешкодженої 2 % розчином фенолу бактерійної маси проводили з послідовним застосуванням 0,5 % розчину ДСН і 0,4 % розчином тритону Х-100. Від детергентів екстракти звільнювали шляхом осадження на холоді, гель-хроматографії та екстрагування хлороформом.

Вміст білку в розчині контролювали шляхом визначення оптичної щільності при 260 и 280 нм, за Lowry, а також методом зв'язування барвника за Bradford (Досон Р. та співавт., 1991). Нуклеїнові кислоти у розчині також визначали за оптичною щільністю. Вуглеводи та ліпіди визначали методом тонкошарової хроматографії, застосовуючи для обробки хроматограм різні реагенти (Досон Р. та співавт., 1991, Кучеренко Н.Е. та співавт., 1988).

Для розділення екстракту на окремі фракції застосовували іонообмінну хроматографію на колонці з ДЕАЕ–целюлозою «Ватман DE–32». В отриманих фракціях визначали вміст білку та нуклеїнових кислот методами, що вказані вище.

Електрофорез у поліакриламідному гелі за Laemmli використовували для тонкого вивчення складу екстрактів, для підтвердження чистоти отриманих хроматографічних фракцій, а також для визначення молекулярних мас окремих компонентів екстрактів (Остерман Л.А., 1981, Laemmli U.K., 1970). З цією метою використовували маркерні білки фірми "Sigma".

Для одержання імунних сироваток використовували 16 кролів. Імунізацію проводили за модифікованою методикою О.Е. В'язова та Ш.Х. Ходжаєва (Вязов О.Е., Ходжаев Ш.Х., 1973) з використанням неповного ад'юванта Фрейнда. Моноспецифічні сироватки одержували шляхом «виснаження» сироватки проти M. kansasii екстрактами наступних видів мікобактерій: M. bovis, M. fortuitum, M. scrofulaceum, M. intracellulare, M. phlei.

Антигенні властивості екстрактів досліджували в реакції преципітації у гелі та методом імуноелектрофорезу. РПГ проводили як двойну радіальну імунодифузію за методом Ouchterlony (Ouchterlony, 1953) у модифікації Л.А. Зільбера (Зильбер Л.А., 1958). Результати відзначали візуально, а також фарбуванням гелевої пластинки та її фотографуванням.

Імуноелектрофорез виконували за модифікованим методом Грабар и Уильямс в 1 % гелі агарози (Grabar P., Williams C.A., 1953). Визначення результатів проводили аналогічно РПГ.

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ

Дослідження умов екстрагування поверхневих компонентів Mycobacterium kansasii

Досліджували вплив ДСН, тритону Х-100, холату натрію та твіну-80 на екстрагування клітинних компонентів M. kansasii. Експерименти у цьому напрямку вели за однаковою схемою:

вивчали вихід білку при концентраціях нижчих за ККМ, дорівнюючих ККМ та вищих ККМ. З'ясовано, що найбільший вихід білку спостерігався при застосуванні ДСН та тритону Х-100. При цьому оптимальними виявилися концентрація ДСН 0,5 % и pH 6,8 та концентрація тритону Х-100 - 0,4% (вага/об'єм) и pH 7,0. Максимальна ж концентрація білку складала відповідно 200 мкг · $см^{-3}$ та 180 мкг · $см^{-3}$. Холат натрію та твін-80 забезпечували вихід білку у концентраціях не вищих, ніж 10 мкг · $см^{-3}$.

Вивчено можливість послідовного застосування найбільш активних детергентів. Для цього спочатку проводили екстрагування ДСН, після чого бактеріальну масу обробляли 0,4 % розчином тритону Х-100 в 0,15 М трис–HCl буферному розчині pH 7,0. Завдяки цьому вдавалося додатково екстрагувати білок у кількості 50 мкг · $см^{-3}$ экстракта.

Неушкодженість бактеріальних клітин протягом екстрагування доводили шляхом забарвлювання за Цілем-Нільсеном з подальшим мікроскопічним вивченням. При цьому було встановлено, що клітини мікобактерій навіть після послідовного застосування детергентів не втрачають кислотостійкости, що свідчить про неушкодженість клітинної стінки мікобактерій. Було встановлено, що вміст нуклеїнових кислот в ектратах при застосуванні пропонованої нами методики екстрагування не був значним, причому визначалася виключно РНК, ДНК ж не була відкрита жодного разу. Руйнування клітин повинне було б супроводжуватися значним виходом нуклеїнових кислот. Це також підтверджувало неушкодженість клітин протягом екстрагування.

Таким чином, було доведено, що одержані екстракти M. kansasii містяли практично лише поверхневі компоненти й не мали суттєвої домішки внутрішньоклітинних компонентів.

Антигенні властивості отриманих екстрактів досліджували в реакції преципітації у гелі. При цьому було встановлено, по-перше, що обробка ДСН не спричинює втрати екстрактами антигенних властивостей (або вони відновлюються) після видалення цього детергенту. По-друге, екстрагування в різних випадках ДСН чи тритоном Х-100 дозволяє вивільнювати різні антигенні компоненти. По-третє, естракти, одержані з використанням холату натрію та твіну-80 антигенних компонентів не містили. Водночас, послідовне застосування ДСН та тритону Х-100 дозволяло вивільнити максимальну кількість антигенних компонентів. Встановлено, що послідовне застосування ДСН та тритону Х-100 дозволяє екстрагувати з бактерійної маси M. kansasii максимальну кількість антигенних компонентів – 4 (за даними РПГ), що більше, ніж у випадку використання кожного з ПАР окремо.

Таким чином, встановлено, що послідовне застосування ДСН та тритону Х-100 призводить до найбільш ефективної солюбілізації антигненних поверхневих компонентів.

Результати розділення екстратів M. kansasii методом електрофорезу в поліакриламідному гелі

Склад екстрактів різних видів мікобактерій досліджували методом електрофорезу в поліакриламідному гелі. Наступне порівняння електрофоретичних картин розділення екстрактів M. kansasii, M. bovis, M. fortuitum, M. scrofulaceum, M. intracellulare та M. phlei дозволило встановити, що бактеріопротеїни розташовуються на фореграмах у широкому диапазоні – від 205 кДа до 14 кДа і менше. В середньому екстракти різних видів мікобактерій містили 20 – 30 електрофоретичних фракцій (електрофореграми екстрактів M. kansasii – 17 фракцій), причому серед них можна було помітити деяки «характерні» за розташуванням, тобто за електрофоретичною рухливістю. Зокрема, електрофореграма екстракту M. kansasii вміщує 6 таких фракцій. Наявність у складі екстракту M. kansasii «характерних» фракцій може дозволити ідентифікувати цей мікроорганізм за його електрофореграмою. Загалом же, електрофоретичне дослідження екстрактів дозволило підтвердити припущення про багатокомпонентний їх склад, тому треба було розділити екстракти на окремі фракції з препаративною метою.

Дослідження фізико–хімічних властивостей екстрактів мікобактерій, розділених методом іонообмінної хроматографії

Спочатку були проведені дослідження оптимальних умов розділення екстрактів мікобактерй на окремі фракції з використанням різних іонообмінників. Встановлено, що для первинного розділення отриманих нами екстрактів M. kansasii оптимальним є використання ДЕАЕ–целюлози. При цьому, як це можна бачити з рисунка 1, екстракти M. kansasii розділяються на три основні групи фракцій: група “А” – ті компоненти, що здатні адсорбуватися на колонці лише за умов зниження концентрації вихідного буферного розчину до 0,05 М; група “В” – компоненти, що адсорбуються при 0,1 М концентрації вихідного буферного розчину з 0,2 М хлоридом натрію і елюються при поступовому підвищенні концентрації хлориду натрію до 1М; група “С” – компоненти, що могли бути елюційовані лише завдяки використанню розчину лугу – 1н. гідроксиду натрію. Первинне розділення не дозволяло провести відокремлення деяких компонентів один від одного, тому проводили рехроматографію кожної групи фракцій з використанням “лінійного” градієнту концентрації хлориду натрію. Внаслідок рехроматографії було одержано 10 хроматографічних фракцій

Фракції досліджували спектрофотометричним методом з метою визначення наявності в них білку та інших складових. Було з’ясовано, що фракції різних груп не однакові за своїм кількісним та якісним складом, що демонструє таблиця 1.

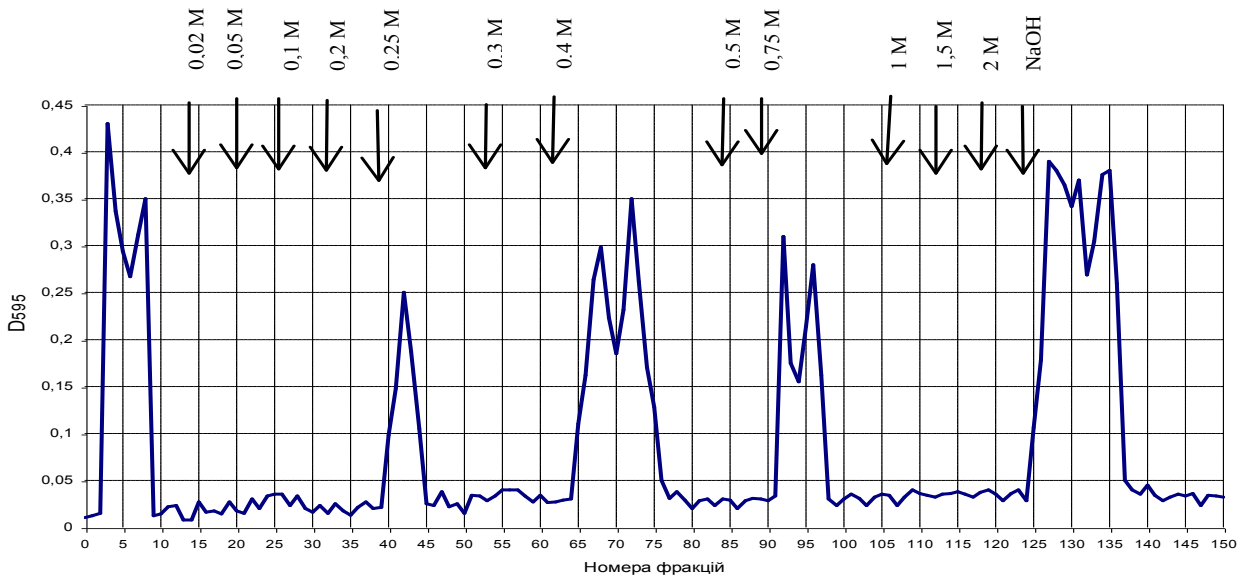

Рис. 1 Хроматограма суцільного екстракту M. kansasii на ДЕАЕ-целюлозі

——— - оптична щільність фракцій, D595; 0,02 М – 2 М – концентрації NaCl у 0,1 М трис-HCl буферному розчині; Фракції 1 – 14 – група «А», фракції 15 – 124 – група «В», фракції 125 – 150 – група «С».

Таблиця 1

Результати спектрофотометричного дослідження фракцій екстракту M. kansasii, що були одержані методом іонообмінної хроматографії

Назва фракції	Властивості, що досліджувалися						
	D_{260}	D_{280}	D_{Lowry}	$D_{Bradford}$	Вміст білку, мкг · см$^{-3}$	Вміст РНК, мкг · см$^{-3*}$	Вміст ДНК, мкг · см$^{-3*}$
A_1	0,163	0,284	2,100	0,260	320	-	-
A_2	0,13	0,225	1,734	0,220	250	-	-
B_1	0,025	0,047	0,464	0,030	51	-	-
B_2	0,103	0,180	1,522	0,200	203	-	-
B_3	0,129	0,225	1,742	0,221	250	-	-
B_4	0,105	0,183	1,544	0,213	205	-	-
B_5	0,110	0,174	1,464	0,192	188	0,6	-
C_1	0,473	0,422	1,962	0,241	295	13,9	-
C_2	0,435	0,384	1,862	0,231	270	12,6	-
C_3	1,044	0,703	1,902	0,242	280	34,6	-

*) Примітка. Відсутність даних у цих стовпчиках означає, що нуклеїнові кислоти у зразках не пробах не знайдені. Вірогідно, це може свідчити про їх відсутність, або про такий вміст, що не перевищував нижню межу чутливості застосованих методів виявлення.

З таблиці можна бачити, що вміст нуклеїнових кислот, зокрема РНК, не корелює зі вмістом білку. Майже вся кількість цієї нуклеїнової кислоти зосередилася у фракціях групи «С». На нашу думку, такий характер перерозподілу РНК є гарантією остаточного очищення білку в інших фракціях від цієї нуклеїнової кислоти. Вірогідно, РНК у цих фракціях зв'язана з білком, тобто там містяться рибонуклеопротеїди. Відсутність же ДНК у складі фракцій ще раз свідчить про те, що її не було в екстракті, тобто суттєвого руйнування клітин у процесі екстрагування не відбувалося.

Оскільки екстракти, крім білку та нуклеїнових кислот могли містити речовини іншої хімічної природи, ми провели дослідження хроматографічних фракцій методом тонкошарової хроматографії із застосуванням різних реагентів для «проявки» хроматограм. Було встановлено, що суцільні екстракти M. kansasii містять речовини вуглеводної та ліпідної природи, однак розподіл таких речовин між хроматографічними фракціями неоднаковий. Вуглеводні компоненти містилися як у фракціях групи "А", так "В", і "С". Це дозволяє припустити, що у всіх цих фракціях наявні глікопротеїди. Компоненти ліпідної природи були зосереджені лише у фракціях B_2, B_4 и B_5. Це дає певні підстави вважати, що у цих фракціях знаходяться, переважно, ліпопротеїди.

Електрофоретичне розділення одержаних хроматографічних фракцій дозволило з'ясувати, що електрофоретична рухливість більшості компонентів, які входять до складу фракцій, не змінилася в ході іонообмінної хроматографії. Однак розподіл бактеріопротеїнів між фракціями не був однаковим. Фракції A_1, A_2, B_1, B_4, C_3 вміщували по одному компоненту, фракції B_2, B_3, B_5, C_1 – по два. Фракція C_2 вміщувала навіть три компоненти. Були визначені молекулярні маси компонентів, що входили до складу хроматографічних фракцій.

Дослідження антигенної будови екстрактів M. kansasii

Було встановлено, що фракції A_2, B_2, B_5, C_2, C_3, не були активними в РПГ. Більшість же імунологічно активних фракцій були антигенно неідентичними та містили компоненти, що могли вступати до перехресних реакцій з сироватками проти інших видів мікобактерій. Лише фракції B_4 та C_1 містили компоненти, що могли бути визнані видоспецифічними для M. kansasii. Водночас, фракції B_4 и C_1 давали реакцію «часткової антигенної тотожності» по відношенню одна до одної.

Методом імуноелектрофорезу в екстрактах M. kansasii було знайдено 9 антигенних компонентів, серед яких є такі, що виявляються лише сироваткою проти M. kansasii, а також такі, що виявляються усіма сироватками, які були взяті до експерименту, що демонструє рисунок 2. З'ясовано, що антигенні компоненти, які були присутні у хроматографічних фракціях A_1, B_1 и B_3 екстракту M. kansasii, присутні також і в екстрактах інших видів мікобактерій. Компоненти ж фракцій B_4 и C_1 були характерні лише для екстракту M. kansasii і не реагували з жодною з узятих до експерименту сироваток проти мікобактерій (M. avium-intracellulare; M. bovis; M. fortuitum; M. phlei; M. scrofulaceum; нормальна кроляча сироватка), що видно з рисунку 3.

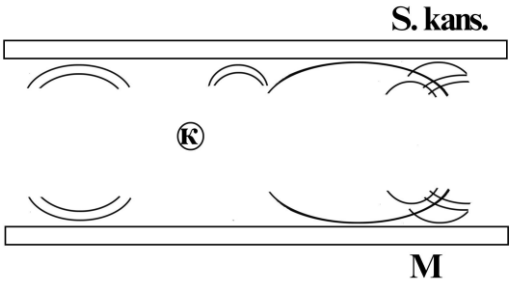

Рисунок 2. Загальна схема результатів імуноелектрофорезу екстракту M. kansasii за участю антисироваток до різних видів мікобактерій: К – екстракт M. kansasii; S_{kans} – антисироватка до M. kansasii; S_{fort} – до M. fortuitum S_{intr} – до M. intracellulare; S_{phl} – до M. phlei; S_{bov} – до M. bovis; S_{scr} – до M. scrofulaceum; М – передбачувана суміш антисироваток до M. fortuitum, M. intracellulare, M. phlei, M. bovis, M. scrofulaceum.

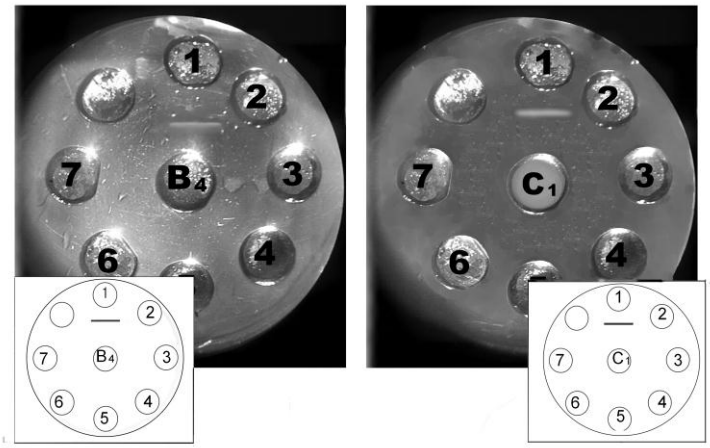

Рисунок 3. Реакційна здатність фракцій B_4 та C_1 по відношенню до сироваток проти різних видів мікобактерій: B_4 – хроматографічна фракція B_4 екстракту M. kansasii; C_1 – хроматографічна фракція C_1 екстракту M. kansasii; 1 – антисироватка до M. kansasii; 2 - антисироватка до M. avium-intracellulare; 3 - антисироватка до M. bovis; 4 - антисироватка до M. fortuitum; 5 - антисироватка до M. phlei; 6 - антисироватка до M. scrofulaceum; 7 – нормальна кроляча сироватка.

Дослідження антигенної специфічності компонентів фракцій з використанням моноспецифічних сироваток дозволило встановити, що, по-перше, моноспецифічні антисироватки “B_4 и C_1” спроможні виявити відповідні їм компоненти екстракту M. kansasii серед екстрактів інших видів мікобактерій, по-друге, компоненти, що присутні у фракціях B_4 и C_1 між собою дають

реакцію «неповної ідентичності», нарешті, компоненти B_4 и C_1 екстракту M. kansasii виявилися спроможними до відкриття специфічних антитіл у сироватках лабораторних тварин. Останнє положення демонструє рисунок 4.

Таким чином, можна вважати, що хроматографічні фракції B_4 и C_1 екстракту M. kansasii містили, щонайменше, один антигенний компонент, що за результатами проведених досліджень можна було вважати видоспецифічним. Молекулярна маса цього компоненту була в межах 72 – 86 кДа. Це речовина білкової природи, що, вірогідно, має вуглеводний або ліпідний компонент як простетичну групу. На основі хроматографичних фракций B_4 и C_1 екстракту M. kansasii в подальшому можливе створення препарату для диагностики мікобактеріозів, що спричинені цим мікроорганізмом.

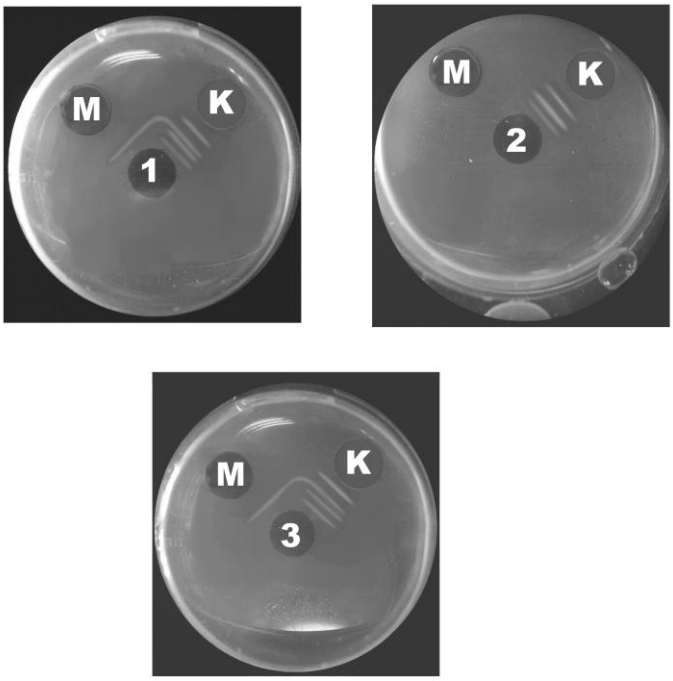

Рисунок 4. Визначення можливості виявлення за допомогою компонентів фракцій B_4 и C_1 специфічних антитіл в антисироватці до M. kansasii: 1 – суміш антисироваток до M. bovis, M. fortuitum, M. scrofulaceum, M. intracellulare, M. phlei, M. kansasii; 2 – суміш антисироваток до M. bovis, M. fortuitum, M. scrofulaceum, M. intracellulare, M. phlei; 3 – суміш антисироваток до M. bovis, M. fortuitum, M. scrofulaceum, M. intracellulare, M. phlei, до фракції B_4 екстракту M. kansasii, до фракції C_1 екстракту M. kansasii; М – суміш фракцій B_4 и C_1; К – суцільний екстракт M. kansasii.

ВИСНОВКИ

1. Розроблені метод та умови екстрагування поверхневих компонентів Mycobacterium kansasii шляхом використання детергентів з різними механізмами солюбілізуючої дії. Встановлено, що послідовне застосування ДСН у концентрації 0,5 % і тритона Х-100 у концентрації 0,4 % дозволяє екстрагувати з інактивованих фенолом мікобактерій більшу кількість антигенних компонентів, ніж застосування кожного з детергентів окремо. Одержані у такий спосіб екстракти M. kansasii містять переважно поверхневі компоненти бактеріальних клітин, про що свідчить збереження мікобактеріями кислотостійкості та відсутність в екстрактах дезоксирибонуклеїнової кислоти.

2. Екстракти поверхневих компонентів M. kansasii являють собою багатокомпонентні системи, які вміщують, за даними тонкошарової хроматографії та електрофорезу в поліакриламідному гелі речовини білкової, ліпідної та полісахаридної природи.

3. Екстракт M. kansasii в результаті електрофорезу в поліакриламідному гелі розділений на 17 компонентів, що відрізнялися електрофоретичною рухомістю. Порівняння електрофоретичних картин розділення екстрактів M. kansasii, M. bovis, M. fortuitum, M. scrofulaceum, M. intracellulare, M. phlei вказало, що в електрофоретичному спектрі M. kansasii можна виділити 6 компонентів, які за своєю молекулярною масою та електрофоретичною рухомістю є характерними для цього мікроорганізму та можуть бути використані для ідентифікації електрофоретичного спектру M. kansasii.

4. Екстракт M. kansasii методом колоночної іонообмінної хроматографії на ДЕАЕ-целюлозі й наступної рехроматографії був розділений на 10 фракцій, котрі відрізнялися міцністю зв'язку з іонообмінником та хімічним складом. За даними електрофорезу в поліакриламідному гелі компоненти фракцій різнилися молекулярною масою, а в реакції преципітації у гелі виявляли неоднакові антигенні властивості. Серед антигенних компонентів є як загальні для ряду фракцій, так і індивідуальні, що притаманні лише одній фракції.

5. Серед виділених фракцій виявлені антигени, які можуть бути визнані видоспецифічними для M. kansasii. Видоспецифічність цих компонентів встановлено в реакції преципітації у гелі та в імуноелектрофорезі, в тому числі, з використанням імунних сироваток, що були виснажені екстрактами M. bovis, M. fortuitum, M. scrofulaceum, M. intracellulare, M. phlei. Подібні антигени не зустрічаються в жодного з представників основних груп мікобактерій. Такі компоненти знаходяться у фракціях B_4 (елююється при концентрації хлориду натрію 0,75 М) та C_1 (елююється при pH буферного розчину до 8,9) і являють собою речовини білкової природи з молекулярною масою в межах 72 - 86 кДа, які містять вуглеводний та ліпідний компоненти. Обидва антигени дають реакцію неповної антигенної ідентичності один з одним в реакції преципітації у гелі.

6. Видоспецифічні компоненти M. kansasii, що їх було виявлено, можуть служити основою для розробки діагностичної тест-системи.

ПЕРЕЛІК НАУКОВИХ РОБІТ, ЩО ЇХ ОПУБЛІКОВАНО ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Грузевский А.А. Современные данные о роли фотохромогенных микобактерий в патологии человека (Обзор литературы) // Проблемы туберкулеза. - 1999. - №6. - С. 58 - 61.

2. Грузевський О.А. Вивчення видоспецифічних компонентів Mycobacterium kansasii за допомогою імунодифузійних методів // Буковинський медичний вісник. - 2000. - № 1. - С. 170 - 174.

3. Протченко П.З., Грузевский А.А., Филиповский А.В., Александрова Л.Н. Изучение протеинового состава и антигенных свойств некоторых видов микобактерий // Експериментальна і клінічна медицина. - 1999. - №2. - С. 75 - 78.

4. Грузевський О.А., Протченко П.З., Філіповський О.В. Вивчення протеїнових екстрактів деяких видів атипових мікобактерій методом іонообмінної хроматографії // Одеський медичний журнал. - 1999. - №4. - С. 12 - 15.

5. Філіповський О.В., Протченко П.З., Грузевський О.А. Використання аніонного детергенту додецилсульфату натрію для екстракції поверхневих протеїнвмісних компонентів мікобактерій // Одеський медичний журнал. - 1999. - №3. - С. 19 - 21.

6. Грузевський О.А., Філіповський О.В. Виділення поверхневих протеїнових компонентів M. bovis та M. kansasii. // Нові технології у навчальному процесі, теоретичній та клінічній медицині (Додаток до “Одеського медичного журналу”). - 1999. - С. 157-159.

7. Протченко П.З., Грузевський О.А., Філіповський О.В. Вивчення поверхневих видоспецифічних компонентів деяких видів атипових мікобактерій // Пленум Українського наукового товариства мікробіологів, епідеміологів та паразитологів ім. Д.К. Заболотного "Наукові та практичні аспекти боротьби з інфекціями в Україні на межі сторіч". Тези доповідей. - Одеса, 2000 р. - С. 86-87.

8. Созінов В.О., Протченко П.З., Грузевський О.А., Александрова Л.М., Філіповський О.В. Дослідження протеїнового складу та антигенної структури деяких видів мікобактерій. // Актуальні проблеми мікробіології, епідеміології, паразитології та профілактики інфекційних хвороб. Тези доповідей XIII з'їзду українського наукового товариства мікробіологів, епідеміологів та паразитологів ім. Д.К. Заболотного. - Київ - Вінниця, 1996. - С. 139 - 140.

9. Грузевський О.А., Філіповський О.В. Антигенна структура та протеїновий склад деяких видів атипових мікобактерій // Науково-практична конференція молодих вчених та студентів, присвячена IV конгресу СФУЛТ. Тези доповідей. - Одеса, 1996. - С. 8 - 10.

АНОТАЦІЯ

Грузевський О.А. Вивчення видоспецифічності поверхневих компонентів Mycobacterium kansasii. – Рукопис.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата медичних наук за спеціальностю 03.00.07 – мікробіологія. – Харківський науково-дослідний інститут мікробіології та імунології ім. І.І. Мечникова МОЗ України. Харків, 2000.

Дисертацію присвячено проблемі пошуку видоспецифічних компонентів Mycobacterium kansasii. Розроблений метод одержання поверхневих компонентів мікобактерій у м'яких умовах. Вивчено картину електрофоретичного розділення екстрактів Mycobacterium kansasii. Одержані електрофореграми дозволяють виділити 6 характерних компонентів, які можуть бути використані для ідентифікації електрофоретичних спектрів екстрактів Mycobacterium kansasii. Вивчено також хімічну природу та молекулярну масу складових екстрактів. Розроблено умови хроматографічного розділення ектрактів на окремі фракції. Проведено дослідження антигенної структури фракцій, показано, що деякі хроматографічні фракції містили антигенні компонентіи, що можуть бути визнані видоспецифічними. Такі компоненти можуть бути використані для створення діагностичної тест-системи.

Основні результати проведених досліджень використовуються в учбових програмах з мікробіології та фтізіатрії в Національній фармацевтичній академії України, Одеському державному медичному університеті, Львівському державному медичному університеті ім. Д. Галицького, Луганському державному медичному університеті, Кримському державному медичному університеті ім. С.І. Георгієвського, Івано-Франківській медичній академії, Тернопільській державній медичній академії ім. І.Я. Горбачевського, Буковинській державній медичній академії.

Ключові слова: атипові мікобактерії, опортуністичні інфекції, видоспецифічні компоненти, антигенна структура, диференційна діагностика, Mycobacterium kansasii, поверхневі структури.

АННОТАЦИЯ

Грузевский А.А. Изучение видоспецифичности поверхностных компонентов Mycobacterium kansasii. – Рукопись.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 03.00.07 – микробиология. – Харьковский научно-исследовательский институт микробиологии и иммунологии им. И.И. Мечникова МЗ Украины, Харьков, 2000.

Диссертация посвящена проблеме поиска видоспецифических компонентов атипичных микобактерий, в частности, их представителя - Mycobacterium kansasii.

Разработан метод получения поверхностных компонентов микобактерий в мягких условиях без разрушения бактериальных клеток, который предусматриваент как использование детергентов в невысоких концентрациях, так и последовательное применение детергентов различной структуры. Отсутствие разрушения бактериальных клеток подтверждено микроскопическим исследованием бактериальной массы после экстрагирования, а также отсутствием в экстрактах определяемых количеств ДНК.

Изучена картина электрофоретического разделения экстрактов Mycobacterium kansasii в полиакриламидном геле, в том числе в сравнении с экстрактами поверхностных компонентов микобактерий – представителей других групп в классификации Runyon (M. bovis, M. avium-sntracellulare, M. scrofulaceum, M. smegmatis, M. fortuitum, M. phlei). При этом показано, что все экстракты являются многокомпонентными системами.

Полученные электрофореграммы M. kansasii позволяют выделить 6 характерных по электрофоретической подвижности компонентов, которые могут быть использованы для идентификации электрофоретических спектров экстрактов Mycobacterium kansasii.

Исследованы также химическая природа и молекулярные массы составляющих экстрактов M. kansasii. Показано, что в их состав входят вещества белковой, липидной, углеводной природы и небольшое количество РНК.

Разработаны условия разделения экстрактов поверхностных компонентов M. kansasii на отдельные фракции методом колоночной ионообменной хроматографии на ДЭАЭ-целлюлозе. При этом показано, что существуют компоненты, слабо адсобирующиеся на ионообменнике, адсорбирующиеся относительно прочно и адсорбирующиеся весьма прочно. Всего получено 10 хроматографических фракций экстрактов поверхностных компонентов M. kansasii.

Проведено изучение антигенной структуры цельных экстрактов M. kansasii и их фракций в сравнении с экстрактами других видов микобактерий в реакции преципитации в геле и иммуноэлектрофорезе. При этом доказано, что последовательное применение для экстрагирования

растворов додецилсульфата натрия и тритона Х-100 позволяет солюбилизировать большее количество антигенных компонентов, чем применение каждого из детергентов в отдельности.

Выявлено, что некоторые хроматографические фракции содержали антигенные компоненты, которые могут быть признаны видоспецифическими на этом этапе исследований. Определена химическая структура и молекулярные массы этих компонентов, а также их способность выявлять антитела к M. kansasii в полиспецифических антисыворотках. При этом антисывротки к M. bovis, M. avium-sntracellulare, M. scrofulaceum, M. smegmatis, M. fortuitum, M. phlei не реагируют с такими компонентами экстрактов M. kansasii. Выявленные видоспецифические компоненты могут быть использованы для создания диагностической тест-системы.

Основные результаты проведенных исследований используются в учебных программах по микробиологии и фтизиатрии в Национальной фармацевтической академии Украины, в Одесском государственном медицинском университете, во Львовском государственном медицинском университете им. Д. Галицкого, в Луганском государственном медицинском университете, Крымском государственном медицинском университете им. С.И. Георгиевского, Ивано-Франковской медцинской академии, Тернопольской государственной медицинской академии им. И.Я. Горбачевского, Буковинской государственной медицинской академии.

Ключевые слова: атипичные микобактерии, оппортунистические инфекции, видоспецифические компоненты, антигенная структура, дифференциальная диагностика, Mycobacterium kansasii, поверхностные структуры.

SUMMARY

Gruzevskiy A.A. The study of species-specificity of Mycobacterium kansasii surface components. - Manuscript.

The dissertation on obtaining of scientific degree of the candidate of medical sciences on speciality 03.00.07 – microbiology. – Research Institute of Microbiology and Immunology named by I.I. Mechnikov, Kharkov, 2000.

The dissertation is dedicated to the problem of looking for species-specific components of Mycobacterium kansasii. The method of obtaining of mycobacterial surface components in mild conditions is elaborated. The picture of electrophoretic division of Mycobacterium kansasii extracts is studied. Obtained electrophoregrams allow to note 6 characteristic components which could be used for identification of electrophoretic spectrums of Mycobacterium kansasii extracts. Chemical nature and molecular weights of extracts components were studied. The conditions of chromatographic division of extracts into isolated fractions are elaborated. The investigation of fractions antigenic structure was

fulfilled. There was revealed that some these fractions contained antigenic components which may be considered as species-specific. Revealed species-specific components could be used for creation of diagnostic test-system.

The main results of fulfilled investigations are used in studying programs in microbiology and phtisiatry in National pfarmaceutical academy of Ukraine, in Odessa state medical university, in Lviv state medical university, in Lugansk state medical university, in Crimean state medical university, in Ivano-Frankivsk state medical academy, Ternopol state medical academy, Bucovina state medical academy.

Key words: atypical mycobacteria, opportunistic infections, species-specific components, antigenic structure, differential diagnostics, Mycobacterium kansasii, surface structures.