

ОТЧЕТ О НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОЙ РАБОТЕ

Тема: Изучение сорбционной способности Рекицена-РД в отношении патогенных и условно патогенных энтеробактерий, обладающих D- маннозочувствительными ресничками общего типа- common pili

Исследование проведено на базе лаборатории генетики вирулентности бактерий ГУ НИИ эпидемиологии и микробиологии им.Н.Ф.Гамалеи РАМН (Москва).

Цель НИР - изучение сорбционной способности Рекицена-РД (производства ЗАО «Ягодное» г. Киров) в отношении пилированных энтеробактерий, лечебных бактериофагов и выявление в его составе различных короткоцепочечных жирных кислот, ассоциированных с молекулярными взаимодействиями у бактерий.

Введение

Препарат Рекицен- РД применяется перорально, влияя неисследованным пока механизмом позитивного действия на нарушенную микроэкологию желудочно-кишечного тракта. Известно, что нормальная микрофлора кишечника является важным фактором общего гомеостаза организма, питает эпителиоциты и другие клетки кишечника, обеспечивая тем самым их физиологическую активность, и поставляет организму энергию в виде короткоцепочечных жирных кислот (КЖК). Собственно микробиоценоз представляет собой сложную многокомпонентную систему, неподдающуюся реконструкции *in vitro*. Это означает, что ведущая роль в поддержании его целостности принадлежит макроорганизму. Используя многочисленные информационные и трофические связи, организм регулирует состав микрофлоры и, если этот состав перестает удовлетворять его потребностям, индуцирует ее отторжение, сопровождающееся симптомами того или иного заболевания. Заболевание может наступать и в том случае, когда организм перестает выполнять свои функции по отношению к микрофлоре.

Таким образом, состояние микробной экологии желудочно-кишечного тракта человека играет важную роль в поддержании его здоровья. К сожалению, данные последних лет свидетельствуют, что в настоящее время у подавляющего большинства россиян имеет место выраженный дисбаланс кишечной микрофлоры, обуславливающий рост числа заболеваний, в той или иной степени, связанных с дисбиозами. В РФ основным средством стабилизации нормобиоценоза продолжают оставаться пробиотические препараты и биологически активные добавки, применяемые перорально. К сожалению, положительный эффект известных пробиотиков, даже при длительном применении, часто носит транзитный характер, особенно при дисбиотических состояниях, отягощающих различные соматические болезни.

Более того, в последние годы увеличилось число патогенных и условно патогенных микроорганизмов, резистентных ко многим этиотропным препаратам, что определяет необходимость поиска новых антибактериальных средств. Поэтому актуальной является детальное изучение позитивных свойств БАД Рекицен-РД

(производства ЗАО «Ягодное» г. Киров)- ферментированных пищевых волокон, полученных из пшеничных отрубей.

В 60-х годах прошлого века было распространено мнение, что на обычных питательных средах дрожжевые клетки антибактериальную активность не выявляют. Вместе с тем, такая активность дрожжеподобных клеток была обнаружена при особых условиях, в частности, при их культивировании на "голодной" среде. Однако в 70-80-х годах прошлого столетия был описан ингибирующий эффект культуральной жидкости сахаромицет на рост различных видов грамположительных и грамотрицательных бактерий. Эффект мог быть связан с наличием термостабильных соединений, в частности, наличием короткоцепочных жирных кислот, играющих немаловажную роль во взаимодействии бактерий с бактериями и бактерий с организмом хозяина. Наличие в препарате Рекицен-РД короткоцепочечных жирных кислот, его влияние на поведение адгезивных патогенных и условно патогенных бактерий и действие на вирионы лечебных бактериофагов не исследованы, что и явилось целью настоящей НИР.

Материалы и методы.

1. Препарат Рекицен- РД. Гранулированная форма препарата Рекицена РД.
2. Штаммы. Сорбционная активность Рекицена- РД изучена в отношении штаммов *E.coli* O111:B4, *E.coli* O127:B8, *E.coli* O126:B14, *E.coli* O157:H7, *E.coli* Hly-147, *Shigella sonnei* NR-18, *Salmonella typhimurium* 415, *Klebsiella pneumoniae* 511 и *Staphylococcus aureus* 209.
3. Изучение влияния Рекицена-РД на вирионы лечебного стафилококкового бактериофага.

Титрование фага проводили по методу Аппельмана.

4. Определение способности препарата Рекицен РД сорбировать ЛПС (эндотоксин) грамотрицательных бактерий.

4.1. ЛАЛ-тест (*Limulus Amebocyte Lysate* - LAL). В работе использовали комплекты фирмы Sigma (США). Тест желирования лизата амебоцитов (ЛАЛ) осуществляли согласно методическим указаниям фирмы "Sigma" ,США (Tech. Вил. N 210). В опытах сорбции эндотоксина Рекиценом- РД использовали лабораторные серии препаратов ЛПС, полученных из эталонных штаммов *Shigella flexneri* 2a 516, *Salmonella typhimurium* 415 и *Klebsiella pneumoniae* 9-19. В качестве контроля использовали препарат эндотоксина *S.minnesota* Re 595 (Sigma, США). Специальной подготовке подвергалась лабораторная посуда, которая в фольге прогревалась в сухо жаровом шкафу при температуре 300°C в течение 3-4 часов. Для разведения образцов использовали апиrogenную воду (фирма Sigma,США).

4.2. Подготовка эталонного стандарта. Апиrogenным шприцом вводили во флакон стандарта 5,0 мл апиrogenной воды и тщательно перемешивали в течение 30 минут. Затем в пронумерованных пробирках с колпачками производили 16 разведений матричного раствора стандарта апиrogenной водой, в соответствии с данными таблицы 1.

Таблица 1. Титрование стандартного раствора эндотоксина.

№ п/п	Объем стандарта	Концентрация в Endotoxin Units (EU/мл)
1.	0,1 мл из флакона + 0,9 воды	400
2.	0,5 мл из 1-ой пробирки + 0,5 воды	200
3.	0,5 мл из 2-ой пробирки + 0,5 воды	100
4.	0,5 мл из 3-ой пробирки + 0,5 воды	50
5.	0,5 мл из 4-ой пробирки + 0,5 воды	25
6.	0,5 мл из 5-ой пробирки + 0,5 воды	12,50
7.	0,5 мл из 6-ой пробирки + 0,5 воды	6,25
8.	0,1 мл из 4-ой пробирки + 0,9 воды	5,00
9.	0,5 мл из 8-ой пробирки + 0,5 воды	2,50
10.	0,5 мл из 9-ой пробирки + 0,5 воды	1,25
11.	0,2 мл из 8-ой пробирки + 0,8 воды	1,00
12.	0,5 мл из 11-ой пробирки + 0,5 воды	0,50
13.	0,5 мл из 12-ой пробирки + 0,5 воды	0,25
14.	0,1 мл из 11-ой пробирки + 0,9 воды	0,10
15.	0,1 мл из 12-ой пробирки + 0,9 воды	0,05
16.	0,1 мл из 14-ой пробирки + 0,9 воды	0,01

4.3. Постановка ЛАЛ-теста.

Для обнаружения эндотоксина образцы разводили в 4 раза буферным раствором и прогревали 1 мин при 100°C (инактивация термолабильных компонентов с целью экстракции ЛПС, являющегося термостабильным). После охлаждения соответственно маркировке в пробирки 1-го ряда вносили по 0,1 мл испытуемых образцов комплекса "Рекицен-ЛПС" (пробы Рекицена- РД, обработанного в течение 2-х часов 400 EU/мл ЛПС) и добавляли по 0,9 мл апиrogenной воды. Далее из пробирок 1-го ряда по 0,1 мл переносили в пробирки второго ряда и добавляли 0,4 мл апиrogenной воды, аналогичную процедуру проделывали с пробирками 3-го и четвертого рядов соответственно. Таким образом, получали разведения образцов комплекса "Рекицен-ЛПС" 1:10, 1:50, 1:1250 1:6250. Затем во все пробирки добавляли равный объем лизата амебоцитов (разведенного апиrogenной водой) и полученную смесь инкубировали в термостате при температуре 37°C в течение 45 минут. Оценку результата производили как визуально, так и под микроскопом на основе метода кристаллографии. Степень полимеризации и кристаллизации лизата амебоцитов в опытных и контрольных образцах сравнивали со стандартными. В зависимости от состояния геля и дисперсности кристаллической сетки, образованной растворенным в инертном растворе лизатом амебоцитов, отбирали образцы с отрицательной и положительной реакцией.

Результаты

1 Исследование сорбционной активности Рекицена-РД в отношении патогенных и условно патогенных бактерий.

Использовали 10% (в конечном объеме) суспензию Рекицена-РД на основе физиол. р-ра поваренной соли. В опытные образцы с начальным объемом 4,5 мл вносили 0,5 мл бактериальной взвеси с концентрацией микробных клеток 10⁹/мл, перемешивали и ставили на инкубацию при 37°C на 30 минут. После инкубации пробирки откручивали при 3 тыс. об/мин в течение 1-2 минут. Осадок набирали бактериологической петлей, наносили на предметное стекло, распределяя суспензию по поверхности стекла, мазок высушивали, фиксировали над пламенем горелки, окрашивали по Граму и микроскопировали.

При микроскопии мазков были видны агрегаты микробных клеток *E.coli* O111:B4, *E.coli* 0127:B8, *E.coli* 0126:B14, *E.coli* 0157:H7, *E.coli* Hly-147, *Shigella sonnei* NR-18, *Salmonella typhimurium* 415, *Klebsiella pneumoniae* 511 и *Staphylococcus aureus* 209. На поверхности мицелл Рекицена-РД бактериальные клетки обнаруживали в единичных случаях. Сделано заключение, что в данных условиях опыта сорбционная активность препарата Рекицен-РД в отношении микробных клеток незначительна.

2 Исследование сорбционной активности Рекицена-РД в отношении эндотоксинов грамотрицательных бактерий.

Проведенные исследования с разными эндотоксинами энтеробактерий различных таксономических групп показали, что Рекицен при соотношении 1 г: 400 ЕУ/мл ЛПС В течении 1,5 часов при 37°C обладал способностью снижать концентрацию ЛПС *Shigella flexneri* 2a 516 и *Salmonella typhimurium* 415 в 1,5-2 раза. В надосадках определяли концентрацию ЛПС, равную 200- 100 ЕУ/мл (2-я и 3-я пробирки). В остальных с 4-й по 16-ю пробирки ЛПС не определялся. Наибольшая сорбционная активность Рекицена-РД обнаружена в отношении ЛПС *Klebsiella pneumoniae* 9-19 - в 10-12 раз (4-я и 5-я пробирки). В остальных с 6-й по 16-ю пробирки ЛПС не определялся. Большой процент сорбции клебсиелл связан, по-видимому, с наличием в препаратах ЛПС уоновых кислот, входящих в состав их полисахаридной капсулы.

Таким образом, препарат Рекицен-РД способен сорбировать ЛПС патогенных и условно патогенных энтеробактерий,

3 Влияние "Рекицена-РД" на титр фаговых частиц.

В работе использовалась 5% (в конечном объеме) суспензия "Рекицена-РД" на основе мясопептонного бульона (МПБ) - опытные образцы, в контроле - МПБ.

В опытные и контрольные пробирки с начальным объемом 4,5 мл добавляли 0,5 мл стафилококкового фага, перемешивали и ставили на инкубацию при 37°C на 18-20ч.

После инкубации пробирки откручивали при 3 тыс. об/мин в течение 1-2 мин для освобождения от крупных частиц, а затем надосадок пропускали через бактериальный фильтр. Число фаговых частиц в полученных фильтратах определяли по методу агаровых слоев. Данные представлены в таблице 2.

Таблица 2. Отсутствие действия Рекицена- РД на частицы стафилококкового бактериофага

Разведение	Количество фаговых колоний	
	без "Рекицена-РД" (контроль)	с "Рекиценом-РД"
1 0-1S	1	0
	0	0
	0	0
10-7	4	1
	3	0
	6	0
10-6	67	2
	57	9
	79	7
концентрация фаговых частиц/мл	$4,81 \pm 3,4 \times 10^7$	$5,47 \pm 4,6 \times 10^6$

Из полученных результатов видно, что существенного снижения концентрации фага не происходит и, следовательно, "Рекицен-РД" может быть использован при лечении одновременно с бактериофагом.

4 Влияние Рекицена- РД на протеазную активность бактерий.

При желудочно-кишечных заболеваниях особое внимание исследователей привлекают протеазы патогенных и условнопатогенных бактерий, способные запускать и поддерживать воспалительные реакции в слизистой кишечника, приводя в конечном итоге к снижению колонизационной резистентности кишечника. У кишечных бактерий известны три типа протеаз: сериновые, тиоловые и металлопротеиназы, рассматриваемые в качестве "экзотоксиновых комплексов", секретируемых во внешнюю среду. Колонизация кишечника протеолитически активными микроорганизмами, в том числе условно патогенными энтеробактериями, ассоциируется с хроническими кишечными инфекциями, протекающими с явлениями дисбактериоза. Накапливание в кишечнике бактериальных протеаз приводит к нарушению микроциркуляции и свертываемости крови; увеличению проницаемости клеточных мембран; гипоксии тканей и снижению колонизационной резистентности слизистой ЖКТ. Способность различных БАДов инактивировать бактериальные протеазы не исследована.

Цель настоящего фрагмента исследования - изучение влияния суспензии и супернатанта Рекицена-РД на бактериальные сериновые, тиоловые и металлозависимые протеазы.

Материалы и методы

Рекицен РД.

Готовили суспензии препарата в дистиллированной воде: 5,0 и 10,0 на 100 мл (5% и 10% суспензии), которые оставляли на магнитной мешалке на 2 часа при 37° С. Супернатанты Рекицена-РД готовили после центрифугирования при 6000 об/мин в

течение 15 мин с последующим отсасыванием надосадочной жидкости. Суспензии и сурпернатанты Рекицена-РД, как правило, использовали в сразу же в день опыта, или хранили в условиях рефрижератора в течение не более 2-3-х суток.

Принцип метода.

Анализ проводят в две стадии. На первой стадии осуществляется инкубация в буферной среде при температуре 37° С в течение часа субстрата (иммуноглобулина) с исследуемым раствором, содержащим продуцируемые во внешнюю среду бактериальные протеазы. На второй стадии реакция протеолиза останавливается охлаждением на ледяной бане и далее проводится сорбция нерасщепленного иммуноглобулина на планшетах для количественного определения величины активности протеаз в исследуемом образце. Состав лабораторного набора для проведения ИФА приведен ниже.

Состав набора

N	Наименование комплектующих	Количество
N		
1	разборный планшет для ИФА	1 шт.
2	субстрат (IgG)	1 фл.
3	раствор №1 буфер для протеолиза IgG	1 фл.
4	ингибитор 1 (фенилметилсульфонилфторид)	1 фл.
5	ингибитор 2 -(Na ₂ -EDTA)	1 фл.
6	Буфер ФСП-Т	1 фл.
7	Цитратный буфер - ЦБ.	1 фл.
8	Хромоген (ОФД)	1 фл.
9	Конъюгат (протеин-А Staphylococcus.aureus)	1 фл.
10	Стоп раствор	1 фл.
11	Калибратор (контроль для ИФА)	1 фл.

4.1 ПРОВЕДЕНИЕ ПЕРВОЙ СТАДИИ РЕАКЦИИ

Схема опыта, 1-й этап: постановка реакции протеолиза 1 час при 37° С.

Подготовка субстрата для реакции протеолиза. Из флакона изымали 100 мкл маточного раствора субстрата (IgG) и разводили в 80 раз раствором ФСП-Т. Готовый разведенный субстрат использовали в реакциях протеолиза и при постановке контроля.

Постановка контроля. Контроль ставился параллельно опыту в трех повторах (лунках), в каждую лунку вносили 200 мкл раствора №1 и к нему добавляли 200 мкл 0,9% раствора хлористого натрия и далее к полученному объему (400 мкл) добавляли 400 мкл приготовленного раствора субстрата. Контроль ставился параллельно с опытом в термостат на 1 час при 37 С.

Постановка протеолитической реакции. Для постановки протеолитической реакции с исследуемыми пробами использовали планшет для протеолиза. Для пробы использовали три лунки планшета. В каждую из трех лунок планшета вносили по 200 мкл образца пробы и 200 мкл раствора №1, тщательно перемешивали пипетированием.

В первую из трех лунок вносили ингибитор-1 (фенилметилсульфонилфторид) - 6 мкл, во вторую ингибитор- 2 (Na₂-EDTA) 20 мкл. Тщательно перемешивали пипетированием. В третью лунку раствор ингибитора не вносили. Затем в каждую из трех лунок планшета вносили по 400 мкл приготовленного раствора субстрата для протеолиза. После добавления раствора субстрата планшет с реактивной смесью для протеолиза инкубировали 1 час при 370 С.

4.2 ПРОВЕДЕНИЕ ВТОРОЙ СТАДИИ РЕАКЦИИ

Холодовая стадия (сорбция IgG на разборном планшете для ИФА).

После истечения 1 часа инкубации в термостате опытные пробы и контрольные извлекали из термостата. Реакция протеолиза останавливается охлаждением. Для этого из всех лунок с пробами и контролем переносят по 200 мкл в промаркированные лунки разборного планшета для ИФА. Планшет помещается в рефрижератор при температуре от 2 – 40 с на час инкубации.

4.3 ПРОВЕДЕНИЕ ТРЕТЬЕЙ СТАДИИ РЕАКЦИИ

Постановка ИФА для определения количества IgG в контроле и нерасщепленного IgG в исследуемых пробах. После холодной инкубации лунки планшета промывали трехкратно ФСР-Т и дистиллированной водой. В каждую лунку вносили 110 мкл раствора конъюгата и инкубировали 45 минут. После инкубации лунки разборного планшета для ИФА промывали трехкратно дистиллированной водой и ФСР- Т. После промывки и стряхивания от остатков влаги, в каждую лунку вносили раствор хромогена. Инкубировали 20 мин в термостате. Останавливали стоп раствором.

Приготовление рабочего раствора ФСР-Т.

Содержимое флакона ФСР- Т разводили дистиллированной водой до конечного объема 250 мл. Готовили разведения калибратора в 40 раз на ФСР- Т. Во все лунки планшета для ИФА вносили по 100 мкл ФСР-Т. В первую и вторую лунку 12- го стрипа вносили раствор калибратора в рабочем разведении. Из второй лунки калибровочного стрипа переносили 100 мкл содержимого в 3-ю лунку и далее делая 2-х кратные разведения до 8 лунки.

Из 8 лунки 100 мкл отбрасывали. Со 2-й по 8-ю лунки вносили по 100 мкл ФСР-Т. Планшет инкубировали на шуттеле 45 мин при 370С. По окончании инкубации планшет промывали 3-х кратно ФСР-Т и 3-х кратно дистиллированной водой. В лунки планшета вносили по 100 мкл рабочего раствора конъюгата и инкубировали при 370С в течение 45 мин на встряхивателе. Планшет промывали 3-х кратно ФСР-Т и 3-х кратно дистиллированной водой. Во все лунки планшета добавляли по 100 мкл раствора хромогена и инкубировали при 370С в течение 30 мин. По окончании инкубации реакцию останавливали внесением в каждую лунку 50 мкл стоп раствора. После остановки реакции лунки планшета фотометрировали при соответствующей длине волны для хромогена.

4.4 РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ.

Результаты ИФА, оценивали путем измерения оптической плотности в лунках разборного планшета ИФА для лунок с контролем, калибратором и для лунок с опытным образцами. По полученным результатам (таблица 3) строили калибровочную кривую зависимости оптической плотности от концентрации. Данные использовали

для расчета активности протеаз в исследуемых образцах.

Таблица 3. Кратность разведения калибратора и концентрация иммуноглобулина

Кратность разведения калибратора	Концентрация мкг/мл	Кратность разведения калибратора	Концентрация мкг/мл
80	0,35	1280	0,02
160	0,175	2560	0,01
320	0,09	5120	0,005
640	0,04	10240	0,0027

РАСЧЕТ АКТИВНОСТИ.

По калибровочной кривой находили концентрации иммуноглобулина, соответствующие оптической плотности для контроля и исследуемых проб, и затем вычисляли среднее значения количества иммуноглобулина в контроле, согласно формулам: Активность протеаз общую и по классам (сериновые, металлозависимые, тиоловые) в растворе выражали в количестве иммуноглобулина, расщепленного за 1 час при 370С в пересчете на 1 млрд микробных тел.

Расчёт активности протеаз проводили по формулам:

ОБЩАЯ (мгIgG/час/млрд бактериальных тел) = (K-1a)xR [1],

R-коэффициент, равный 3300

Активность сериновых протеаз по формуле:

СЕРИНОВАЯ=(K-1a)-(K-2a) x R [2].

Активность металлозависимых протеаз по формуле:

МЕТАЛЛОЗАВИСИМАЯ=(K-1a)-(K-3a) x R [3]

Активность тиоловых протеаз по формуле:

ТИЛОВАЯ = **ОБЩАЯ** - (сериновая+ металлозависимая)[4].

5 РЕЗУЛЬТАТЫ

4.5 Подготовка субстрата для реакции протеолиза

В качестве субстрата использовали фармакопейный препарат "Иммуноглобулин человеческий нормальный", выпускаемой отечественной промышленностью, содержащий в основном иммуноглобулины класса IgG.

4.6 Определение 19-инактивирующей активности бактерий эталонных штаммов E.coli O157 и K.oxytoca, секретирующих различного типа протеазы.

В качестве продуцентов протеаз использовали штаммы E.coli O157:H7 EDL 933 и K. oxytoca 2416. Бактерии штамма энтерогеморрагической E.coli O157:H7 дополнительно к шига-подобному энтеротоксину, продуцируют оригинальную сериновую протеазу, расщепляющую иммуноглобулины и V фактор свертываемости крови. Используемый в данной работе бактерии K. oxytoca 2416 характеризовались способностью к синтезу термолабильного энтеротоксина и секретировали во внешнюю среду одновременно три протеазы: сериновую, тиоловую и металлозависимую. Наличие elt гена у бактерий K. oxytoca 2416 было установлено научным сотрудником

лаб.генетики вирулентности бактерий Н.А. Шабановой с помощью ПЦР. Бактериальную культуру, выращенную в пробирке на скошенном мясопептонном агаре, смывали стерильным физиологическим раствором в мясопептонный бульон (МПБ) объемом 5 мл. Затем инкубировали в течение 2-х часов на качалке при 37°C. Бактериальную взвесь отделяли от жидкой среды центрифугированием при 6000 об/мин в течение 15 мин. Концентрацию микробных клеток, содержащихся в исходном объеме МПБ, определяли предварительно спектрофотометрически по оптической плотности с последующим определением количества КОЕ/мл на чашках с МПА. Расчет активности вели на 1 млрд микробных клеток.

4.7 Проведение протеолитической реакции.

Центрифугат, содержащий около 5 млрд/мл осажденных микробных клеток, в объеме 200 мкл (1 млрд микробных клеток) вносили в лунки серологического планшета. Для одного образца использовали три лунки планшета. В каждую из трех лунок планшета, содержащих 200 мкл бактериальной суспензии, вносили по 200 мкл раствора 0,05 М трис- (оксиметил)-аминометан-НСl буфера (рН 7.8) и тщательно перемешивали пипетированием. В первую из трех лунок вносили раствор ингибитора сериновых протеаз - фенилметилсульфонилфторид (ФМСФ - ингибитор-1) в объеме 5 мкл, во вторую вносили раствор ингибитора металлопротеаз - динатриевую соль этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТА - ингибитор-2) в объеме 20 мкл. Реакционную смесь перемешивали пипетированием. В третью лунку для определения общей протеолитической активности растворы ингибиторов не вносили. В лунки с анализируемыми образцами вносили по 400 мкл рабочего раствора иммуноглобулина (субстрат). Рабочий раствор иммуноглобулина готовили в концентрации 0,1 мг/мл в 0,05 М трис- (оксиметил)-аминометан-НСl буфере. Параллельно исследуемым образцам ставился контроль, состоящий из 200 мкл стерильного мясо-пептонного бульона, 200 мкл 0,05 М трис-(оксиметил)-аминометан-НСl буфера и 400 мкл рабочего раствора субстрата. Исследуемые пробы и контроль инкубировали в течение 1 часа при 37°C, затем реакцию протеолиза останавливали охлаждением на ледяной бане в течение 15 мин.

4.8 Регистрация результатов активности супернатанта и суспензии Рекицена- РД

В соответствии с целью исследования необходимо было выяснить, способны ли супернатант и суспензии Рекицена-РД инактивировать или сорбировать ферменты патогенности (протеазы) энтеробактерий. Для этого после остановки охлаждением реакции протеолиза проводили адсорбцию остающегося в пробах нерасщепленного иммуноглобулина на сенсibilизированном антигеном планшете. Из лунок серологического планшета с реакционной смесью переносили анализируемые образцы и контроль в лунки стрип-планшета для ИФА и инкубировали в течение 45 мин при Т +40 с. После инкубации лунки планшета промывали трехкратно раствором ФСП- Т и дистиллированной водой.

Во все лунки вносили раствор конъюгата и инкубировали в течение 45 мин. В качестве конъюгата для количественного определения сорбированного нерасщепленного IgG использовали белок А Staphylococcus aureus (с высокой константой связывания к Fc-фрагменту IgG) с пероксидазой хрена (Sigma, USA). От избытка конъюгата после инкубации лунки планшета промывали трехкратно раствором ФСП-Т и вносили по 100 мкл раствора хромогена (ОФД). После 25-

минутной инкубации при $22\pm 4^{\circ}\text{C}$ реакцию останавливали внесением в каждую лунку 50 мкл стоп раствора (0,2 М раствор серной кислоты). Результаты ИФА регистрировали фотометрически. Измерение оптической плотности (ОП) проводили не позднее, чем через 30 мин после остановки хромогенной реакции.

4.9 Определение потенциальной инактивирующей активности Рекицена-РД в отношении бактериальных протеаз.

К суспензии протеазоактивных бактерий в объеме 10 мл (содержащих 1 млрд/мл микробных клеток) добавляли равный объем 5% или 10% суспензии или супернатанта Рекицена (в соотношении 1: 1) и инкубировали в течение 30 мин при 37°C . Пробу в объеме 1 мл, разведенную стерильным физиологическим раствором хлористого натрия в соотношении 1 : 1 , центрифугировали при 6000 об/мин 15 мин и в надосадке определяли активность расщепления иммуноглобулина протеазами.

Количество нерасщепленного иммуноглобулина в лунках с исследуемыми образцами и контролем (иммуноглобулин + бактериальная суспензия) определяли по калибровочному графику. Для этого по оптической плотности (ОП) лунок с контролем и исследуемым образцом находили количество нерасщепленного иммуноглобулина, остающегося после воздействия на субстрат в течение 1 часа 1 млрд суспензии бактерий *E. coli* O157 и *K. oxytoca*, синтезирующих протеазы во внешнюю среду.

4.10 Определение активности Рекицена-РД при учете количества нерасщепленного IgG в образце с протеазами.

Расчеты количества оставшегося нерасщепленного иммуноглобулина в контрольных образцах с IgG, обработанным бактериальными протеазами, представлены в таблице 4. Эти данные необходимы для дальнейших исследований влияния супернатанта и суспензий Рекицена-РД на бактериальные протеазы.

Таблица 4. Количество оставшегося нерасщепленного IgG в контрольных пробах

Название лунок	Количество нерасщепленного IgG (в мкг)
Контроль субстрата (IgG)	0,028±0,0090
IgG + 1 млрд E.coli O157 без ингибитора	0,006±0,0009
IgG + 1 млрд K.oxytoca без ингибитора	0,004±0,0005
IgG + 1 млрд E.coli и ингибитором -1*	0,009±0,0008
IgG + 1 млрд K.oxytoca и ингибитором-1	0,005±0,0006
IgG + 1 млрд E.coli O157 и ингибитором-2**	0,009±0,0008
IgG + 1 млрд K.oxytoca и ингибитором-2	0,004±0,0005

Примечание: *ингибитор-1 раствор ФМСФ, **ингибитор-2 раствор ЭДТА.

Далее были проведены исследования по возможному влиянию супернатантов Рекицена-РД на иммуноглобулины класса G (таблица 5). Как видно из данных таблицы 5, супернатант Рекицена-РД не обладал ферментативной активностью в отношении IgG в образцах без бактериальных протеаз.

Таблица 5. Внесение супернатанта Рекицена-РД в систему иммуноглобулинов

Название лунок	Количество нерасщепленного IgG (в мкг)
Контроль субстрата (IgG)	0,026±0,006
IgG + супернатант Рекицена (CP)	0,024±0,008
IgG+супернатант Рекицена с ингибитором-1 *	0,022±0,009
IgG+супернатант Рекицена с ингибитором-2*	0,023±0,007

*Ингибитор-1 раствор ФМСФ, ингибитор-2 раствор ЭДТА.

Следующая серия экспериментов была проведена на возможность использования супернатантов Рекицена-РД для подавления действия сериновой протеазы энтерогеморрагических E. coli 015 7 (таблица 6). Как видно из данных таблицы 5, супернатанты Рекицена-РД практически не инактивировали действие сериновой протеазы ЭГКП, которая сохраняла способность гидролизовать IgG (в тест-пробах из 0,026 мкг иммуноглобулина-субстрата оставалось во всех аранжировках опытов 0,007-0,008 мкг IgG).

Таблица 6. Отсутствие действия супернатанта Рекицена-РД в отношении IgG в образцах с бактериальными протеазами*.

Реакционная смесь	Общая протеолигическая активность (остающийся нерасщепленный IgG в мкг)
Контроль IgG + E.coli 0157	0,006±0,0009
IgG + CP + E.coli 0157	0,008±0,003
Контроль IgG + K.oxytoca	0,009±0,004
IgG+ CP+ K. ахуюса	0,007±0,003

Примечание: CP- Супернатант Рекицена-РД

"Исходное количество IgG в растворе = 0,026±,006 мкг

Тем не менее, в опытах с суспензиями Рекицена-РД были получены ярко выраженные результаты по сорбции различных бактериальных протеаз (таблицы 7 и 8). В присутствии суспензии Рекицена-РД количество сериновой протеазы ЭГКП (*E.coli* 0157) уменьшалось примерно в 3 раза и достигало при расчете остающегося негидролизованного IgG = 0,017- 0,018 мкг (при контроле гидролиза IgG сериновой протеазой до остаточного уровня = 0,006 мкг (таблица 7).

Таблица 7. Сорбционная активность 5% и 10% суспензии Рекицена-РД в отношении сериновой протеазы *E.coli* O157*

Реакционная смесь	Общая активность (остающийся нерасщепленный IgG в мкг)	Активность сериновой протеазы (остающийся нерасщепленный IgG в мкг)
<i>Контроль (IgG + E.coli 0157)</i>	0,006±0,0009	0,005±0,0009
<i>IgG + E.coli 0157+ 5% Суспензия Рекицена-РД</i>	0,017±0,0003	0,016±0,0008
<i>IgG + E.coli 0157+ 10% Суспензия Рекицена-РД</i>	0,018±0,0003	0,017±0,0004

"Исходное количество IgG в растворе = 0,026±0,006 мкг"

Сходные данные были получены и при изучении сорбции 5% и 10% суспензиями Рекицена IgG протеаз *Klebsiella oxytoca* (таблица 8).

Таблица 8. Сорбционная активность 5% и 10% суспензии Рекицена-РД в отношении протеаз *Klebsiella oxytoca**

Реакционная смесь	Общая активность	Сериновая	Металло-зависимая	Тиоловая
<i>Контроль (IgG + K. oxytoca)</i>	0,006	0,002	0,002	0,001
<i>IgG + K. oxytoca + 5% Суспензия Рекицена</i>	0,019	0,004	0,007	0,008
<i>IgG + K. oxytoca + 10% Суспензия Рекицена-РД</i>	0,016	0,004	0,004	0,008

"Исходное количество IgG в растворе = 0,026±0,006 мкг"

Таким образом, суспензии Рекицена-РД способны сорбировать сериновую IgG-протеазу энтерогеморрагической кишечной палочки *E.coli* 0157:H7, а так же сериновую, металлозависимую и тиоловую протеазы *Klebsiella oxytoca*. Супернатанты Рекицена-РД ингибирующего действия на активность бактериальных протеаз не оказывают.

6 Определение содержания короткоцепочечных жирных кислот (КЖК) в супернатанте Рекицена-РД.

Предварительно готовили образцы. Навеску 0.1г Рекицена-РД помещали в пробирку с коническим дном, приливали 2 мл дистиллированной воды и 1 мл стандартного раствора, перемешивали путем встряхивания в течение 10 минут, добавляли 0,5 мл 1 N HCl (для определения связанных кислот) (при определении свободных кислот добавление HCl не требуется), центрифугировали при 5000 об/мин в течение 10 мин.

Методом газожидкостной хроматографии исследовали количественное и качественное содержание короткоцепочечных жирных кислот.

Микрошприцем вводят пробу надосадочной жидкости, полученной после центрифугирования исследуемого образца, около 1 мкл в испаритель хроматографа с детектором ионизации в пламени, снабженном кварцевой капиллярной колонкой длиной 36 м с внутренним диаметром 0,32 мм с неподвижной фазой в виде пленки толщиной 0,33 мкм.

Режим работы хроматографа: изотермический с температурой термостата 1500С, температурой испарителя и детектора 2300С. Газ-носитель - азот, расход газа-носителя 2,0 мл/мин, воздуха 300 мл/мин. Соотношение потоков газа - носителя на сброс и в колонку 50: 1. Время хроматографирования около 8 мин.

Определение абсолютного содержания индивидуальных кислот в смеси осуществляли как путем расчета площадей хроматографических пиков как методом «треугольника», так и методом компьютерной обработки хроматограмм.

Определяли относительное содержание (т.е. отношение концентрации данной кислоты к общей суммарной концентрации кислот) уксусной, пропионовой, масляной кислот в суммарном содержании C2-C4, значения окислительно-восстановительного потенциала среды, выраженного значениями Анаэробного индекса (АИ)², относительного суммарного содержания изокилот (Σ изоCn), отдельно изоC5/C5 в содержании C2-C6. По результатам исследования делают вывод о количественном содержании КЖК в образце.

Результаты. Как установлено, показатели относительного содержания кжк в супернатанте Рекицена-РД находились для уксусной кислоты в пределах $6,300 \pm 0,02$, пропионовой - $0,129 \pm 0,01$, масляной кислоты - $0,111 \pm 0,03$, изомаляной - $0,037 \pm 0,01$, валериановой - $0,058 \pm 0,01$ и капроновой - $0,058 \pm 0,01$ в суммарном относительном содержании C2-C6. Значения Анаэробного индекса, характеризующего окислительно-восстановительный потенциал препарата, находятся в области отрицательных значений $-0,54 \pm 0,01$. Следует указать, что в супернатантах фекалий здоровых людей показатели относительного содержания уксусной кислоты находятся в пределах $0,634 \pm 0,014$, пропионовой - $0,189 \pm 0,011$ и масляной кислоты - $0,176 \pm 0,011$ в суммарном относительном содержании C2-C6. Следует отдельно рассмотреть вопрос о качественном и количественном содержании КЖК в различных сериях препарата Рекицен-РД для заключения и практических рекомендаций.

ОБСУЖДЕНИЕ

При желудочно-кишечных заболеваниях особое внимание исследователей привлекают протеазы патогенных и условно патогенных бактерий, деградирующие секреторные и плазменные иммуноглобулины, компоненты комплемента, белки межклеточного матрикса, воздействующие на эндотелий сосудов, активирующие

компоненты свертывающей системы крови и фибринолиза. При уремическо-гемолитическом синдроме, вызываемым энтерогеморрагическими кишечными палочками серогруппы 0157:H7 сериновая протеаза играет важную роль в расщеплении V фактора свертываемости крови и инактивации иммуноглобулинов различных классов. Протеазы способны запускать и поддерживать воспалительные реакции в слизистой кишечника, приводя в конечном итоге к снижению колонизационной резистентности кишечника. У кишечных бактерий известны три типа протеаз: сериновые, тиоловые и металлопротеиназы, рассматриваемые в качестве "экзотоксиновых комплексов", секретируемых во внешнюю среду. Колонизация кишечника протеолитически активными микроорганизмами, в том числе условнопатогенными энтеробактериями, ассоциируется с хроническими кишечными инфекциями, протекающими с явлениями дисбактериоза. Накапливание в кишечнике бактериальных протеаз приводит к нарушению микроциркуляции и свертываемости крови (1); увеличению проницаемости клеточных мембран (2); гипоксии тканей (3) и снижению барьерной функции (колонизационной резистентности) слизистых оболочек (4). Полученные при изучении Рекицена-РД данные о его способности инактивировать бактериальные протеазы указывают на возможные механизмы профилактирующего и лечебного действия препарата при острых и хронических кишечных инфекциях и дисбактериозах.

Данные о сорбции эндотоксина грамотрицательных бактерий суспензией

Рекицена-РД имеют важное значение для практики. Известно, что при стрессовых состояниях и различных заболеваниях может наблюдаться увеличенное поступление эндотоксина грамотрицательных бактерий в кровоток и снижение антиэндотоксинового иммунитета, что приводит к развитию эндотоксиновой агрессии - проявлению патогенного действия ЛПС.

Сепсис и синдром неспецифического системного воспаления также ассоциируется с эндотоксиновой агрессией. Несмотря на огромное число работ, посвященных этому вопросу, и значительные успехи в области выяснения механизмов развития септического шока, показатели смертности остаются на высоком уровне (до 80%). Эндотоксины энтеробактерий вызывают сложный гуморальный и клеточный ответ через индукцию цитокинов и других медиаторов из клеток иммунной системы макроорганизма, которые инициируют генерализованную воспалительную реакцию, результатом чего на терминальной стадии являются гипотензия, сердечно-сосудистые расстройства и мультиорганная патология.

С помощью различных методов определения ЛПС в системном кровотоке подтверждено участие эндотоксина в патогенезе различных инфекционных и неинфекционных заболеваний, таких как гестозы, эклампсия, острые вирусные респираторные заболевания, гепатиты, атеросклероз и инфаркт миокарда, сепсис, множественные дисфункции органов и другие. При дисбактериозах кишечника также определяется повышенное содержание эндотоксина в системном кровотоке.

Эти данные указывают на важность проблемы профилактики системной эндотоксинемии с помощью Рекицена-РД. Так как основными поставщиками эндотоксина являются бактерии, содержащиеся в кишечнике, то сорбция эндотоксина в просвете желудочно-кишечного тракта должна вести к снижению поступления эндотоксина в системный кровоток. Определенное значение имеет и инактивация бактериальных протеаз.

Заключение

1. Суспензии препарата «Рекицен-РД» обладают определенной способностью к адсорбции патогенных и условно патогенных энтеробактерий, обладающих D-маннозачувствительными ресничками общего типа- common pili.
2. Суспензии препарата "Рекицен-РД" способны сорбировать ЛПС патогенных и условнопатогенных энтеробактерий, в том числе, шигелл, сальмонелл, патогенных кишечных палочек и клебсиелл .
3. Суспензии препарата "Рекицен-РД" активно сорбируют сериновую IgG-протеазу энтерогеморрагической кишечной палочки E.coli O157:H7, а так же сериновую, металлозависимую и тиоловую протеазы энтеротоксигенных клебсиелл.
4. Супернатанты препарата "Рекицен-РД" ингибирующего действия на активность бактериальных протеаз не оказывают.
5. В составе препарата "Рекицен-РД" содержатся важные короткоцепочечные жирные кислоты, требующего дальнейшего исследования.
6. Механизмом профилактического и терапевтического действия препарата Рекицен-РД являются сорбционная способность в отношении бактериальных протеаз, ЛПС грамотрицательных бактерий и наличие в его составе короткоцепочечных жирных кислот.

Литература

1. Бондаренко В.М. Токсические биомолекулы патогенных энтеробактерий. Аграрная Россия. 2002,2:29-32.
2. Бондаренко В.М., Воробьев А.А. Дисбиозы и препараты с пробиотической -функцией. Журн. микробиол. 2004,1:84-92.
3. Бондаренко В.М., Лиходед В.Г., Яковлев М.Ю. Определение эндотоксина грамотрицательных бактерий в крови человека. Журн.микробиол. 2002,2:83-89.
4. Бондаренко В.М., Агапова О.В., Виноградов Н.А. Роль бактериальной протеазы, деградирующей секреторный иммуноглобулин А, в персистенции клебсиелл. Журн. микробиол.2000, 4:12-16.
5. Бондаренко В.М., Мавзютов А.Р., Агапова О.В. Сериновые протеазы грамотрицательных бактерий: структура, механизмы секреции, биологическая активность. Журн.микробиол. 2002,6:80-85.
6. Бондаренко В.М., Чуприна Р.П., Воробьева М.А. Механизм действия пробиотических препаратов. БиоПрепараты, 2003, 3:2-5.
7. Бондаренко В.М., Грачева Н.М. Препараты пробиотики, пребиотики и синбиотики в терапии и профилактике кишечных дисбактериозов. Фарматека. 2003. NQ 7. С. 56-63.
8. Бондаренко В.М.,Грачева Н.М.,Мацулевич Т.В. Дисбактериозы кишечника у взрослых. КМК Scientific Press. М., 2003, 224с.
9. Бондаренко В.М., Чуприна Р.П., Аладышева Ж.И., Мацулевич Т.В. Пробиотики и механизмы их лечебного действия. Эксперим. и клин. гастроэнтерол. 2004. NQ3. С.83- 87.
10. Горская Е.М., Бондаренко В.М., Шогенова Ю.С. и др. Протеолитическая активность содержимого толстой кишки в норме и при микрoэкологических нарушениях. Журн.микробиол. 1995,3:116-120.
11. Зинкевич О.Д., Бондаренко В.М., Тюрин Ю.А.и др. Клинико- диагностическое значение оценки активности Ig-протеаз у детей с дисбактериозом кишечника. Журн. микробиол.2004, 3: 73-77.
12. Кузиков А.Н., Бондаренко В.М., Лыкова Е.А. и др. Особенности протеолитической активности содержимого толстой кишки при дисбиотических состояниях. Журн. микробиол. 1998, 1: 80-83.
13. Лыкова Е.А., Бондаренко В.М., Воробьев А.А. и др. Бактериальная эндотоксинемия у детей при кишечных дисбактериозах. Журн.микробиол.1999, 3:67-70.
14. Отраслевой Стандарт «Протокол ведения больных. Дисбактериоз кишечника» (ОСТ 91500.11.0004-2003), утвержден Приказом Министерства здравоохранения РФ (NQ 231 от 09.06.2003).
15. Budova o. The killer phenomen in yeasts. Folia Microbiol. 1986, (31):422-433.
16. Hagenhoff G. Prevention der antibiotika-assoziierten diaphoe mit, Saccharomyces boulardii. TW Pediatrie.1990, 3 :21-28.
16. Izgu F. Altinbay D. Killer toxins of certain yeast strains have potential growth inhibitory activity on Gram-positive pathogenic bacteria. Microbios. 1997, (89):15- 22.
17. Klauser T., Pohlner J.,Meyer T.F. The secretion pathway ofIgA protease-type protein in gram-negative Bacteria.Bioessays.1999,15(12):799-805.
18. Martinac B., Zhu H., Kubalski A. Yeast K1 killer toxin forms ion channels in sensitive

yeast spheroplasts and in artificial liposomes. Cell Biology. 1990, (87): 6228-6232.

19. Rao M.B., Tanksale A.M., Ghatge M.S. et al. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. Microbiol.Mol.Biology Rev.1998,62(3):597-635. 21. Schmitt M.J., Breing F. The viral killer system in yeast: from molecular biology to application. FEMS Microbiol.Rev. 2002, (26):257-276.

20. Stein M., Kenny B., Stein M. A. et al. Characterization of EspC, a 110- kilodalton protein secreted by enteropathogenic E.coli which is homologous to members of the immunoglobulin protease-like family of secreted proteins. J.Bacteriol.1996, 178(22):6546-6554.

Руководитель НИР

Ответственный исполнитель
научный сотрудник



Бондаренко В.М.

Коновалова Г.Н.