

The dynamics of change of lipid hydroperoxides content, enzymatically active ceruloplasmin concentration, and superoxide dismutase and glutathione peroxidase activities in blood serum of 3-month old rats under long-term administration of thyroxine and in the process of forming of immune response to diphtheria and tetanus anatoxins of ADT-vaccine was investigated. There was revealed that in response to thyroxine administration the content of lipid peroxidation products was increased and the activity of antioxidant enzymes was decreased. The content of enzymatically active ceruloplasmin and glutathione peroxidase activity were shown to be increased in blood serum of hyperthyroid rats in the process of forming of immune response to diphtheria and tetanus anatoxins of ADT-vaccine.

KEY WORDS: prooxidant-antioxidant balance, thyroxine, ADT-anatoxin, rats

УДК: 616.98: 579. 841. 11.

БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* ПРИ КУЛЬТИВИРОВАНИИ НА РАЗЛИЧНЫХ ИСКУССТВЕННЫХ ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕДАХ

Н.И. Городницкая, А.В. Мартынов, Т.П. Осолодченко

Институт микробиологии и иммунологии имени И.И. Мечникова АМН Украины г. Харьков, Украина

РЕЗЮМЕ

В работе представлены результаты изучения биологических свойств вакцинного штамма *Pseudomonas aeruginosa* № 66-16 при культивировании на различных питательных средах. В результате проведенных исследований было установлено, что морфологические, культуральные и биохимические свойства не отличались при культивировании *Pseudomonas aeruginosa* на стандартных средах и на средах, полученных путем кислотного гидролиза продуктов переработки крови.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: штамм *Pseudomonas aeruginosa* № 66-16, биологические свойства, питательные среды

Синегнойная палочка является одним из главных этиологических факторов более чем 70% случаев гнойно-септических заболеваний, и борьба с этим заболеванием остается актуальной задачей современной медицины. Одной из проблем в лечении синегнойной инфекции является плазмидо-опосредованная множественная антибиотикорезистентность [1, 2].

В последние годы наблюдается быстрое развитие биотехнологии, поэтому наряду с антибиотиками широко используют в профилактике и лечении синегнойной инфекции продукты микробного происхождения – вакцины, анатоксины, бактериофаги. Важным этапом в создании технологии производства таких препаратов является подбор и оптимизация питательной среды для культивирования и наращивания биомассы продуцента. При производстве и разработке питательных сред особое внимание уделяется доступности сырья, где особое место занимают продукты службы крови (сыворотки, плазма, эритроцитарная масса, отходы гамаглобулинового производства) [3,4].

Целью нашей работы было сравнить биологические свойства вакцинного штамма *Pseudomonas aeruginosa* № 66-16, который используется в производстве анатоксина синегнойной палочки, а также вакцин и диагностических препаратов, при культивиро-

вании на стандартных питательных средах и средах, полученных из промышленных отходов крови.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для культивирования нами был использован штамм *Pseudomonas aeruginosa* № 66-16, который используется в разработках вакцин и анатоксинов. Штамм *Pseudomonas aeruginosa* культивировался в аэробных условиях при температуре 37 °С 18-24 часа на мясопептонном агаре с добавлением раствора 40% глюкозы. Культуру одновременно выращивали на средах Эндо, где можно было различить 5 типов колоний:

- 1) простые неправильной формы;
- 2) колонии, напоминающие колонии *E. coli* в S-форме;
- 3) складчатые (цветок маргаритки);
- 4) слизистые;
- 5) карликовые или точечные.

Также в опыт брали селективные среды 2-х типов. Первый тип – это среды с ацетамидом, где включение ацетамида как составной части такой среды обусловлено тем, что в отличие от других грамотрицательных микроорганизмов, а также от всех остальных видов *Pseudomonas*, синегнойная палочка обладает способностью использовать это соединение в качестве единственного источника азота и углерода. Второй тип – среды, в

состав которых входят химические вещества, обладающие антимикробным действием в отношении бактерий – возможных ассоциантов синегнойной палочки, а в качестве селективного агента добавляли цетилтриметиламмоний бромид (цетримид-агар). При культивировании вакцинного штамма учитывали: морфологию клеток при микроскопии (размер клеток, ширина и длина). Морфологию колоний (размер, пигментобразование, цвет, структура) определяли при культивировании на питательных средах (на кровяном агаре устанавливали наличие зон гемолиза, на средах Чистовича – реакцию лизиса). Нарастивание биомассы культуры микроорганизмов определяли по логарифмической степени роста. Концентрацию белка в экзотоксине, который является основным компонентом вакцины, определяли фотокolorиметрическим методом, предварительно проведя отмывание буферным раствором и центрифугирование биомассы культуры клеток при 3000об/мин 30' [5]. Для определения биохимических свойств использовали реакции ферментации глюкозы и цитохромоксидазы.

Сырьем для экспериментальных сред служили: эритроцитарная масса крови человека с просроченным сроком годности (10 лет хранения), отходы IV-й фракция гаммаглобулинового производства, которая состоит из смеси иммуноглобулинов и альбумина, отходы V-й фракции – чистый альбумин. Питательную среду готовили следующим образом: 100 г исходного сырья (отходы крови) растирали в ступке и заливали 12 н соляной кислотой на сутки, а затем в течение 3-х дней отмывали водой. Смесь фильтровали и стерилизовали в автоклаве 30 минут при давлении 1 кг/см². После автоклавирования полученную смесь осветляли активированным углем, затем определяли аминный азот как критерий питательной основы, автоклавировали при 1 кг/см² в течение 30 минут, отстаивали, промывали повторно. После повторного автоклавирования проверяли концентрацию аминного азота, доводили рН до 7,2, затем добавляли

агар-агар в

концентрации 2,0% (2,0 г агара на 100 мл среды) и проводили повторную стерилизацию. Всего было приготовлено 5 серий среды на каждую основу. В качестве контроля на разных этапах исследования использовали мясопептонный бульон (МПБ), бульон Мартена, а также при культивировании питательный агар (МПА) на основе мясопептонного бульона [6]. Определяли М – среднее значение показателя аминного азота, m – стандартное отклонение. Полученные результаты обрабатывались статистически [7].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В результате эксперимента было установлено, что оптимальным подходом к получению питательных основ из промышленных отходов крови, включающих показатели степени расщепленности сырья, накопления аминного азота, физико-химические свойства и биологические характеристики питательной среды, может служить использование кислотного гидролизата, независимо от белковой основы исходного сырья.

Одним из наиболее значимых критериев качества питательной среды является концентрация аминного азота. Соответственно, был поставлен опыт по определению количества аминного азота в питательной основе в зависимости от способов его получения из различных промышленных отходов крови.

Как видно из приведенных данных в табл. 1, полученные гидролизаты характеризуются высоким содержанием аминного азота (329,8±11,66) мг% по сравнению со стандартным мясопептонным бульоном, где концентрация азота составляет (85,7±12,2) мг%, однако достоверно ниже, чем в бульоне Мартена (490,0±27,6) мг%. Высокие значения аминного азота отмечались в средах, полученных из эритроцитарной массы и отходов IV и V фракции гаммаглобулинов, которые проводились при гидролизе уксусной и соляной кислотами (347,2±10,7) мг%.

Таблица 1

Концентрация аминного азота в составе питательных сред, полученных из промышленных отходов службы крови (M±m)

Вид гидролиза	Показатели аминного азота при различных типах гидролиза из отходов крови в мг%		
	Эритроцитарная масса	Отходы IV фракции	Отходы V фракции
HCl 37,0 %	332,5±10,2	333,2±9,5	326,8±12,8
Уксусная кислота 0,2 %	323,0±12,5	322,4±11,6	316,7±11,2
HCl 37,0 % + уксусная кислота 0,2%	354,5±9,8	347,4±12,3	339,8±10,1
NaOH 20,0 %	325,1±11,9	328,3±11,5	318,6±11,4
NaOH 20,0% + уксусная кислота 0,2%	320,0±17,6	331,3±10,7	329,7±11,8
Контроль:	МПБ	85,7±12,2	
	Бульон Мартена	490,0±27,6	

Примечание: n*=6, p<0,05

Из данных гидролизатов были приготовлены питательные среды для культивирования опытного штамма. Морфологические, культуральные и биохимические свойства *Pseudomonas aeruginosa* изучались на опытных средах.

Конечную концентрацию аминного азота подбирали опытным путем с учетом количество выросших колоний на средах, полученных из разного сырья и с различной концентрацией аминного азота. В эксперименте бы-

ло отмечено, что с нарастанием концентрации аминного азота от 140-180 мг% и выше, количество колоний на приготовленных средах на порядок снижается или не меняется по сравнению с культивированием на стандартных средах, что указывает на перенасыщенность среды питательной добавкой. Поэтому для опытных питательных сред концентрация аминного азота составила 100-120 мг%, что соответствует показателям стандартизированных сред (табл. 2).

Таблица 2
Сравнительная характеристика биологических свойств штамма *Pseudomonas aeruginosa* № 66-16 при культивировании на различных питательных средах (M±m)

Свойства	Среда Эндо	Среда 1 типа	Среда 2 типа	R-масса	Отходы IV-й фракции	Отходы V-й фракции	Контроль МПА
Размер колоний	0,2±0,05 мм	0,2±0,05 мм	0,2±0,05 мм	0,2±0,05 мм	0,2±0,05 мм	0,2±0,05 мм	0,2±0,05 мм
Морфология колоний	Металлические, фиолетово-красные колонии, слизистые колонии, напоминающие <i>E. coli</i> в S-форме	Сине-зеленые колонии, слизистые колонии	Сине-зеленые колонии, слизистые колонии	Зеленоватые слизистые колонии	Зеленоватые слизистые колонии	Зеленоватые слизистые колонии	Зеленоватые слизистые колонии
Морфология клеток	Гр-палочка, 1,5-3,0* 0,4-0,6 мкм, (одиночно, парами, короткие цепочки)	Гр-палочка, 1,5-3,0* 0,4-0,6 мкм, (одиночно, парами, короткие цепочки)	Гр-палочка, 1,5-3,0* 0,4-0,6 мкм, (одиночно, парами, короткие цепочки)	Гр-палочка, 1,5-3,0* 0,4-0,6 мкм, (одиночно, парами, короткие цепочки)	Гр-палочка, 1,5-3,0* 0,4-0,6 мкм, (одиночно, парами, короткие цепочки)	Гр-палочка, 1,5-3,0* 0,4-0,6 мкм, (одиночно, парами, короткие цепочки)	Гр-палочка, 1,5-3,0* 0,4-0,6 мкм, (одиночно, парами, короткие цепочки)
Лецитиназа	+	+	+	+	+	+	+
Ферментация глюкозы	+	+	+	+	+	+	+
Цитохром-оксидаза	+	+	+	+	+	+	+
*Количество микроорганизмов при засеве 10 ⁴ кол/мл	5,5±0,5	5,5±0,5	5,5±0,5	5,5±0,5	5,5±0,5	5,5±0,5	5,5±0,5
Количество белка в экзотоксине мг/мл	2,2±0,5	2,4±0,4	2,3±0,4	2,1±0,3	2,0±0,2	2,0±0,3	2,4±0,5

* Учет обсемененности по степени логарифмирования. Результат через 24 часа.

Биологические свойства штамма *Pseudomonas aeruginosa* 66-16 при культивировании на различных питательных средах и морфология колоний (размеры, пигмента-

ция) была однотипной. В зависимости от типа среды наблюдалось изменение цвета среды и колоний от зеленого до зеленовато-синего. Исследования биохимических свойств,

таких как ферментация глюкозы, лецитиназная реакция, наличие зон гемолиза и тест на цитохромоксидазу показали, что штамм *Pseudomonas aeruginosa* 66-16 сохраняет эти свойства при росте на средах из промышленных отходов крови, а микроскопия нативных мазков свидетельствовала о наличии грамотрицательных, небольших по размеру полиморфных палочек, у которых не наблюдалось каких-нибудь отличий. Культивирование *Pseudomonas aeruginosa* на различных промышленных стандартных средах, а также опытных средах, показало отсутствие достоверных различий между этими двумя группами. Критерием ростовых качеств питательных сред является увеличение микробной биомассы при культивировании. Исследование по учету количества выросших колоний указывает на увеличение биомассы микроорганизмов при культивировании на экспериментальных средах, полученных из эритроцитарной массы. Степень роста *Pseudomonas aeruginosa* на средах из отходов гаммаглобулинового производства была ниже, чем на контрольных. Это свидетельствует о целесообразности использования данных сред в промышленной микробиологии. Учет концентрации белка вакцинного штамма *Pseudomonas aeruginosa* №66-16 показал, что его концентрация в экзотоксине синегнойной палочки достоверно не

изменяется при культивировании на различных экспериментальных питательных средах.

ВЫВОДЫ

1. Разработана методика получения питательной основы путем кислотного гидролиза продуктов переработки крови.
2. На полученных экспериментальных средах проведено сравнительное изучение морфологических, культуральных и биохимических свойств штамма *Pseudomonas aeruginosa* № 66-16, где показано что свойства штамма не отличались.
3. Концентрация белка в экзотоксине, полученного из штамма *Pseudomonas aeruginosa* № 66-16, который является основным компонентом вакцины, не отличается при культивировании на различных питательных средах.

Перспективы дальнейшего исследования в этом направлении. Дальнейшее изучение морфологических, культуральных и биохимических свойств штамма *Pseudomonas aeruginosa* № 66-16 на новых питательных средах, полученных путем гидролиза продуктов переработки крови, позволит применять данные среды для культивирования штамма *Pseudomonas aeruginosa* № 66-16 при создании вакцинных препаратов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Порт С.В. Адгезивні та колонізаційні властивості клінічно значущих штаммів *Pseudomonas aeruginosa*.// Автореф. дис. ... канд. мед. н. Харків. - 2006. - С. 24.
2. Григоров Ю.Б., Тарабан И.А., Порт Е.В. // Харківська хірургічна школа. - 2004. - № 4 (13). - С. 70-73.
3. Городницька Н. І., Ясна Н.С., Мартинов А.В., и др. // Аналі Мечниківського інституту. - 2006. - № 3. - С. 56-60. (www.imiamn.org/journ).
4. Пиотрович В.А. Разработка питательных сред для культивирования клеток. Автореф. дис. ... канд. мед. н. Київ. - 2002. - С. 18.
5. Межидов М.М. Справочник по микробиологическим питательным средам. -М.: Медицина. - 2003. - 306 с.
6. Ніколаєнко В.М., Осолодченко Т.П., Чупрінова С.І., та ін. // Вісник Харківського національного університету ім. В.Н. Каразіна. Серія «Медицина». - Харків. - 2006. - № 738. - вип. 13. -С. 40-43.
7. Дрегваль О.А., Черватюк И.В., Черевач Н.В. // Мікробіологічний журнал. - 2003. - Т. 65. - № 3. - С. 14-20.

БІОЛОГІЧНІ ВЛАСТИВОСТІ *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* ПРИ КУЛЬТИВУВАННІ НА РІЗНИХ ШТУЧНИХ ЖИВИЛЬНИХ СЕРЕДОВИЩАХ

Н.І. Городницька, А.В. Мартинов, Т.П. Осолодченко

Інститут мікробіології і імунології імені І.І. Мечникова АМН України, м. Харків, Україна

РЕЗЮМЕ

В роботі представлені результати вивчення біологічних властивостей вакцинного штаму *Pseudomonas aeruginosa* № 66-16 при культивуванні на різних живильних середовищах. В результаті проведених досліджень було встановлено, що морфологічні, культуральні та біохімічні властивості не відрізнялись при культивуванні *Pseudomonas aeruginosa* на стандартних середовищах та на середовищах, отриманих шляхом кислотного гідролізу продуктів переробки крові.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: штам *Pseudomonas aeruginosa* № 66-16, біологічні властивості, живильні середовища

BIOLOGICAL PROPERTIES OF *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* GROWN IN DIFFERENT ARTIFICIAL NUTRITIONAL MEDIA

N.I. Gorodnytska, A.V. Martynov, T.P. Osolodchenko

I.I. Mechnykov Institute of Microbiology and Immunology of the Academy of Medical Science of Ukraine, Kharkiv

SUMMARY

In this article the results of study of biological properties of *Pseudomonas aeruginosa* № 66-16 vaccine strains, that was cultivated in different artificial nutritional media were presented. It was shown, that mediums from industrial waste don't differ from standart ones by *Pseudomonas aeruginosa* strains properties, that cultivated on.

KEY WORDS: *Pseudomonas aeruginosa* № 66-16, biological properties, nutritional media

УДК: 615.015:547.581.2

НЕЙРОЛЕПТИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ НАТРИЕВОЙ СОЛИ 5-N, N-ДИЭТИЛСУЛЬФАМОИЛ-3-МЕТОКСИФЕНИЛАНТРАНИЛОВОЙ КИСЛОТЫ

Л.В. Григорьева

Харьковский национальный университет имени В.Н. Каразина, Украина

РЕЗЮМЕ

Изучено нейролептическое действие и острая токсичность натриевой соли 5-N, N-диэтилсульфамойл-3-метоксифенилантраниловой кислоты (условное название метсульфенилат) в опытах на крысах линии Вистар и белых беспородных мышях. Установлено, что метсульфенилат влияет на спонтанную, вертикальную и горизонтальную двигательную активность, ориентировочную реакцию, оказывает миорелаксирующее действие, нарушает координацию движений, потенцирует действие наркотических веществ, уменьшает фенаминовую стереотипию, проявляет каталептогенное действие, вызывает увеличение латентного периода наступления условного оборонительного рефлекса избегания, а также повышает порог эмоциональных реакций у лабораторных животных. Острая токсичность метсульфенилата оказалась в 2,3 раза меньше, чем у аминазина.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: метсульфенилат, спонтанная, вертикальная и горизонтальная двигательная активность, ориентировочная реакция, координация движений, фенаминовая стереотипия, миорелаксирующее и каталептогенное действие, условные рефлексы, эмоциональные реакции, аминазин, барбитал-натрий, этаминал-натрий, гексобарбитал, тиопентал-натрий, хлоралгидрат

Синтезированные и внедренные в практику первые психофармакотерапевтические средства – нейролептики до настоящего времени занимают центральное место в современном лечении многих психических заболеваний и в том числе – шизофрении. По данным ВОЗ, шизофрения занимает девятое место по частоте среди причин инвалидности и является одним из самых «дорогих» психических заболеваний, поскольку обычно поражает больных в молодом возрасте, на пике их продуктивной деятельности [9, 12].

Опыт применения классических (типичных) нейролептических препаратов с момента использования хлорпромазина в психиатрической практике насчитывает более чем полувековой период. Нейролептические средства оказывают многогранное действие на организм и в первую очередь – своеобразное

успокаивающее действие, сопровождающееся уменьшением реакций на внешние стимулы, ослаблением психомоторного возбуждения и аффективной напряженности, подавлением чувства страха, ослаблением агрессивности. Другим, не менее важным, эффектом нейролептиков является наличие у них антипсихотической активности, то есть способности подавлять бред, галлюцинации, автоматизм и другие психопатологические синдромы [8, 1].

Указанные основные свойства типичных нейролептических препаратов по современным представлениям обусловлены их общими нейрохимическими механизмами действия, заключающимися в способности избирательно блокировать дофаминовые D₂-рецепторы различных отделов головного мозга [6].