

УДК 619:614.48:616:579.873.21

ИЗМЕНЧИВОСТЬ ОБЛУЧЕННЫХ МИКОБАКТЕРИЙ

*Кассич В.Ю., *Левченко А.Г., **Кассич А.В.

*«Сумский национальный аграрный университет», г. Сумы, Украина

**«Харьковская государственная зооветеринарная академия», г. Харьков, Украина

После облучения гамма-излучением в дозах 0,00645 – 0,0645 Кл/кг (25–250 Р) ультраструктура *Mycobacterium bovis* и атипичных не изменяется. При этом в препаратах преобладают микробные клетки в процессе изоморфного деления, а при культуральных исследованиях отмечается ускорение роста микобактерий, что свидетельствует о стимулирующем действии малых доз радиации на репродуктивную активность микобактерий.

Облученные γ -излучением в дозах 154,8–206,4 Кл/кг (600 тыс.–800 тыс. Р) микобактерии бычьего вида и атипичные приобретают дегенеративные изменения, которые приводят к прекращению их репродуктивной активности.

The Mycobacterium bovis and atypical nonphotochromogenic ultrastructure has not been changing after the gamma irradiation of 0,00645–0,0645 C/kg (25–250 R). Meanwhile, microbial cells during their fission process dominate in medicines but according to the studies of cultures, the Mycobacterium growth acceleration has been marked to prove the stimulating action of low doses of radiation on the reproductive Mycobacterium activity.

After high doses of gamma irradiation (154,8–206,4 C/kg) (600 thousand–800 thousand R) Mycobacterium bovis and atypical cultures are characterized by degenerative changes, leading to the reproductive death of cultures.

Ключевые слова: туберкулёз, микобактерии, изменчивость, электронная микроскопия, ультраструктура, ионизирующая радиация.

Keywords: tuberculosis, mycobacteria, electron microscopy, ultrastructure, ionizing radiation.

Введение. Значение аллергических проб, как основного метода прижизненной диагностики туберкулёза, определяется их высокой специфичностью [1, 2, 3]. Однако реакции на туберкулин при проведении аллергических исследований на туберкулёз могут проявляться и при сенсибилизации макроорганизма атипичными микобактериями [4, 5], микроорганизмами, принадлежащими к родам *Corynebacterium* [6], *Nocardia* и *Rhodococcus* [7] или под воздействием на организм неблагоприятных факторов [8].

Одной из причин проявления неспецифических реакций может быть аутоенсибилизация продуктами распада собственных тканей организма, что особенно выражено при лучевом поражении. В результате аварии на Чернобыльской АЭС радионуклидами загрязнено 17 областей Украины, а также значительная часть территории Беларуси и России [9]. В таких условиях особое значение приобретает определение эпидемиологического и эпизоотологического значения микобактерий в условиях воздействия ионизирующей радиации, что определяет актуальность данной работы.

При изучении биологических свойств возбудителя туберкулёза на радиоактивно загрязнённых территориях ряд исследователей отмечает его изменчивость в широком диапазоне: патогенные, атипичные, мелкогранулярные формы, устойчивые к изониазиду и рифампицину L-формы [1–3]. Другие авторы [4–6] отмечают потерю микобактериями репродуктивной активности после воздействия гамма-излучения в дозах 500 тыс. Р. Целью данной работы было изучение ультраструктуры микобактерий после облучения стерилизующими дозами γ -излучения.

Материалы и методы исследований. В работе использованы референтный (он же производственный при изготовлении ППД-туберкулина для млекопитающих) штамм *M. Bovis Valle* (КМИЭВ – 9КМ), депонированный в Депозитории ДНКИБШМ под номером 539; и атипичные микобактерии *M. scrofulaceum* (штамм 31/82) и *M. intracellulare* (штамм 78/98), накопление бактериальной массы которых проводили на средах Левенштейна-Иенсена и Павловского. Микроорганизмы подвергали облучению дозами 0,00645–206,4 Кл/кг (25–800 тыс. Р) на γ -излучателях РОКУС (источник излучения ^{60}Co , Р (экспозиция)=0,0138 Гр/сек) и «Исследователь» (источник излучения ^{60}Co , Р=180 Р/сек, 200 Р/ч, 400 Р/мин соответственно). Контролем были необлученные культуры.

Препараты из микобактерий штамма *Mycobacterium bovis Valle* (КМИЭВ – 9КМ), предварительно инактивированного автоклавированием при 101°C в течение 30 мин., для электронно-микроскопического исследования готовили по методике, которая включала отбор клеточного материала; фиксацию микроорганизмов; отмывку от фиксатора; химическое обезвоживание [17–18]. После контакта с каждым раствором суспензию микроорганизмов подвергали центрифугированию. Модификация методики заключалась в подборе минимального времени фиксации, достаточного для получения качественных РЭС-фотографий, доступной схемы химического обезвоживания и оптимальных параметров центрифугирования.

Суммарное время фиксации составляло 1 час и 30 мин., замену фиксатора осуществляли через 45 мин. Во время фиксации растворы периодически суспендировали легким встряхиванием пробирок. После каждой смены фиксатора растворы центрифугировали и сливали надосадочную жидкость. При этом, как оптимальный мы выбрали режим центрифугирования в 1500 оборотов/мин

продолжительностью 5 мин.

В качестве фиксатора использовали глутаровый альдегид на фосфатном буфере Миллонига, который отличается быстрым проникновением и стабилизацией морфологических структур в клетках за счет «сшивания» белковых полимеров, входящих в состав клеточных мембран.

Отмывку от фиксатора выполняли по завершению времени контакта с раствором глутарового альдегида. Отцентрифугированную суспензию заливали в соотношении 1:10 фосфатным буферным раствором, доводили рН до 7,2–7,4 и выдерживали 15 мин., осаждали в центрифуге, надосадочную жидкость сливали.

Для электронно-микроскопического исследования препараты (культуры микобактерий на питательных средах) фиксировали в 1% забуференном растворе четырехоксида осмия в течение 2–3 часов при температуре 4 С, отмывали в буферном растворе, дегидратировали в спиртах возрастающей концентрации и ацетоне и вносили в смесь эпоксидных смол (эпон-аралдит). Полимеризацию белков осуществляли в термостате при температуре 60 С на протяжении двух суток.

Ультратонкие срезы готовили на ультрамикротоме УМТП-6 и после контрастирования цитратом свинца изучали под электронным микроскопом ЕМВ-100 БР с ускоряющим напряжением 75 кВт. Увеличение подбирали адекватно цели исследований [3].

Для электронно-микроскопического исследования препараты (культуры микобактерий на питательных средах) фиксировали в 1% забуференном растворе четырехоксида осмия в течение 2–3 часов при температуре 4 С, отмывали в буферном растворе, дегидратировали в спиртах возрастающей концентрации и ацетоне и вносили в смесь эпоксидных смол (эпон-аралдит). Полимеризацию белков осуществляли в термостате при температуре 60 С на протяжении двух суток.

Ультратонкие срезы готовили на ультрамикротоме УМТП-6 и после контрастирования цитратом свинца изучали под электронным микроскопом ЕМВ-100 БР с ускоряющим напряжением 75 кВт. Увеличение подбирали адекватно цели исследований.

Результаты исследований. При изучении препаратов с необлученных культур *M. bovis* на средах Павловского и Левенштейна-Иенсена отмечали, что микобактерии имеют вид коротких или умеренно длинных овоидных палочек, иногда расположенных в виде значительных скоплений, конгломератов (рисунок 1).

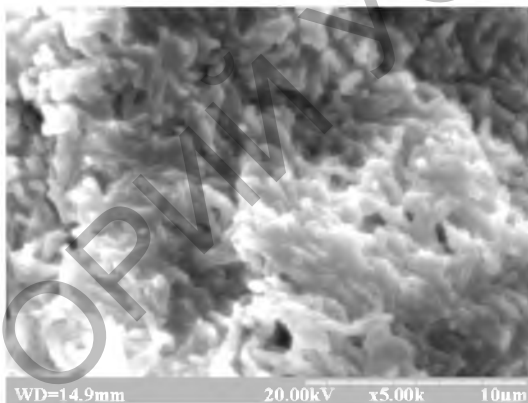


Рисунок 1 – Конгломерат палочкообразных микобактерий штамма *Mycobacterium bovis* Valle (КМИЭВ – 9КМ) до облучения

Отмечается значительный полиморфизм культур (рисунок 2), который зависит от срока выращивания и среды культивирования. Внутри клеток заметна зернистость (зерна Муха). Большие зерна расположены, как правило, ближе к полюсам клетки.

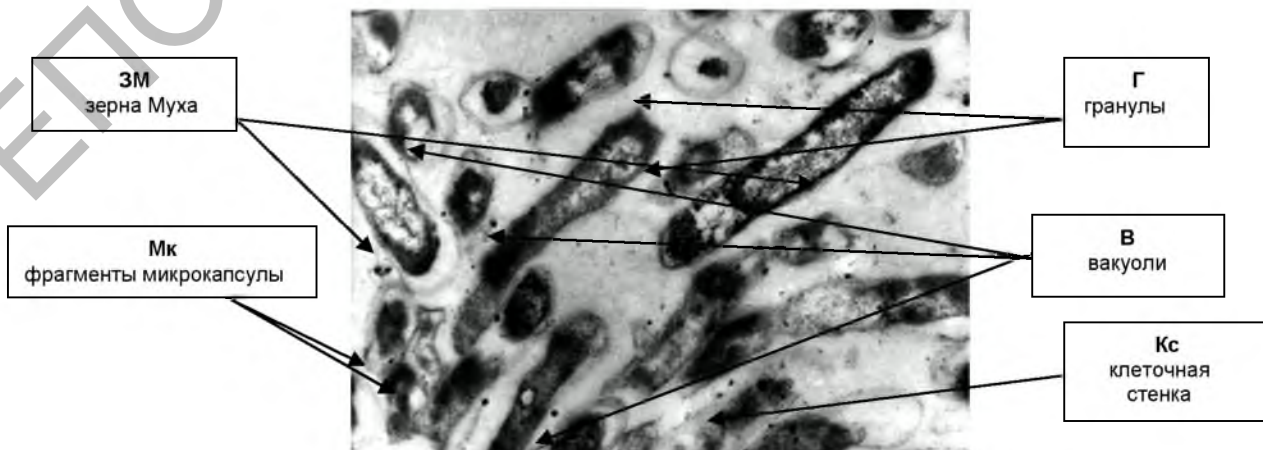


Рисунок 2 – *M. bovis* Valle (КМИЭВ – 9КМ), облученные стимулирующей дозой γ -излучения 0,039Кл/кг (150 Р). В препарате преобладают удлиненные палочкообразные микроорганизмы на разных стадиях деления. Увеличение: 24000 × 2,4

Заметна бугристая неровная поверхность микробных клеток, межклеточные ретикулярные тяжи. В отдельных микобактериальных клетках, находящихся на разных стадиях деления, заметен нуклеоид. Характерно, что в этих препаратах преобладают микробные клетки в стадии репродукции на различных этапах изоморфного разделения. Обращает на себя внимание преобладание в продуктах удлинённых и палочковидных форм, что свидетельствует о тенденции к более интенсивному развитию и размножению облученной в дозовой диапозоне 25–250 Р (0,00645–0,0645 Кл/кг) культуры. Полученные данные соответствуют результатам культуральных исследований облученных малыми дозами микобактерий, которые свидетельствуют об ускорении их репродуктивной активности. Таким образом установлено, что микроструктура микобактерий туберкулёза после облучения низкими (стимулирующими) дозами радиации не нарушается, а репродуктивная активность возрастает.

При исследовании препаратов *M. bovis* и *M. scrofulaceum*, облученных γ -излучением в дозах 154,8–206,4 Кл/кг (600 тыс.–800 тыс. Р) при мощности дозы Р=2 Гр/с, установлено, что клетки микобактерий при таких дозовых нагрузках теряют четкость очертаний структурных элементов, приобретают ярко выраженную деструктивную зернистость [ДЗ] (крупные зерна). Отмечается частичный распад клеточной стенки и цитоплазматической мембраны. Клеточная стенка приобретает многочисленные деструктивные повреждения и участки отслаивания цитоплазматической мембраны. Сама цитоплазматическая мембрана в большинстве случаев подвержена частичному лизису. Клетки микобактерий становятся неструктурированными, их очертания размытые (рисунок 3). Некоторые клетки *M. scrofulaceum* приобретают измененную, нетипичную форму (рисунок 4).

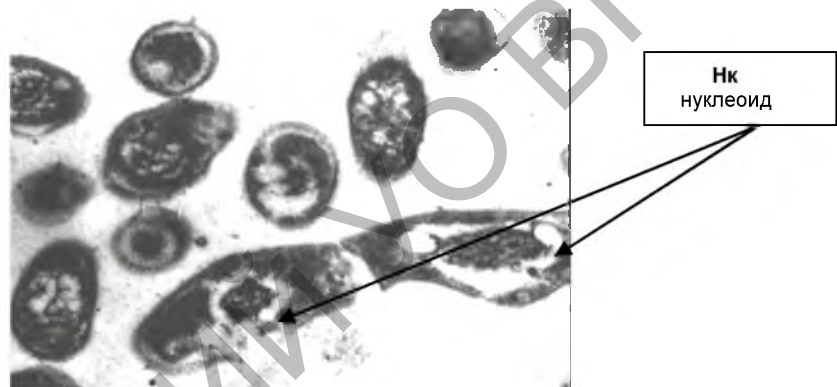


Рисунок 3 – *M. scrofulaceum* на среде Павловского. Момент расхождения дочерних клеток в процессе изоморфного деления. Увеличение: 30000×2,4

В некоторых препаратах заметны клетки с перетяжками и межклеточными ретикулярными тяжами. На поперечных и продольных срезах в некоторых микробных клетках виден нуклеоид (ядерная субстанция) [Нк] на разных стадиях развития и деления (рисунок 4).

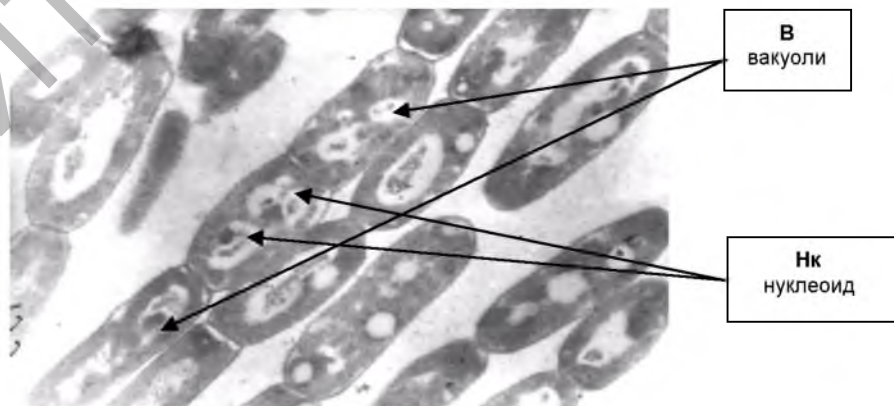


Рисунок 4 – *M. intracellulare* (штам 609) на среде Павловского (7 суток культивирования) после облучения стимулирующей дозой 0,039Кл/кг (150 Р) γ -излучения. Изоморфное деление. Увеличение: 30000×2,4

Кроме того, в цитоплазме некоторых клеток заметны микрогранулы и вакуоли [В]. Отдельные микрогранулы в некоторых случаях образуют макрогранулы, которые по размеру достигают диаметра бактериальных клеток, вследствие чего наблюдается неровная поверхность последних.

В цитоплазме большинства микобактерий появляются грубогранулярные структуры и участки значительной электронной плотности. В большинстве клеток заметны крупные осмиофильные гранулы (зерна) – деструктивная зернистость [ДЗ] (рисунок 5). В некоторых микобактериальных клетках заметны уплотнения цитоплазмы с образованием крупногранулярных структур [КС]. Описанные изменения свидетельствуют о дегенеративных процессах, приводящих к гибели

микобактериальных клеток от высоких (стерилизующих) доз радиации в результате денатурации нуклеиновых кислот и белков. Микробных клеток в процессе репродукции в препаратах из облученных высокими дозами радиации культур микобактерий не обнаружено. Культуральные и биологические исследования микобактерий, облученных высокими дозами радиации, показали полную потерю репродуктивной активности (отсутствие роста на элективных питательных средах, отсутствие клинических и патологоанатомических признаков заболевания у зараженных облученным возбудителем туберкулеза животных).

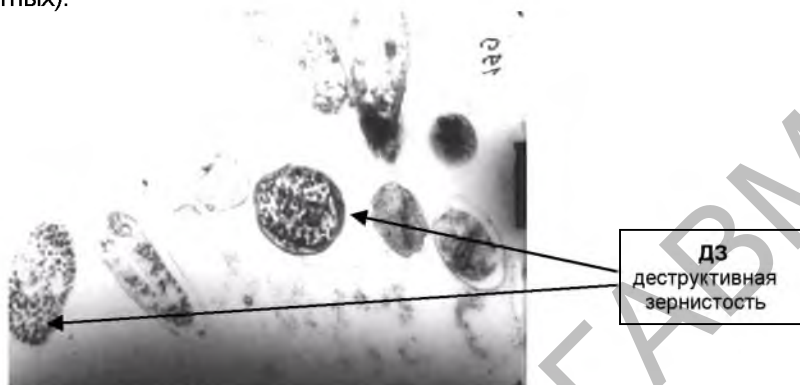


Рисунок 5 – *M. bovis* на среде Павловского (7 суток культивирования) после облучения стерилизующей дозой гамма-излучения 154,8 Кл/кг (600 тыс. Р). Микробные клетки теряют четкость очертаний структурных элементов. В цитоплазме – нетипичная, деструктивная зернистость. Увеличение: 30000 × 2,4

На поверхности некоторых клеток можно различить участки слоя средней электронной плотности, которые определяли как фрагменты микрокапсулы [Мк]. Под микрокапсулой наблюдали осмиофобный пласт неравномерной толщины – внешний слой клеточной стенки, под которым обнаруживали электронно-плотный слой, имеющий гомогенную структуру. Этот слой определяли как собственно клеточную стенку [КС] (рисунок 6).



Рисунок 6 – *M. scrofulaceum* на среде Павловского (10 суток культивирования) после облучения стерилизующей дозой γ -излучения 206,4 Кл/кг (800 тыс. Р). Форма микробных клеток нетипична для данного вида микобактерий. Заметны уплотнения цитоплазмы с образованием крупногранулярных структур [КС]. Увеличение: 33000 × 2,4

Ультраструктура облученных микобактерий. Обращает на себя внимание преобладание в препаратах из облученных дозами 0,00645–0,0645 Кл/кг (25–250 Р) культур удлиненных палочкообразных форм микобактерий (рисунок 1), а также микробных клеток в стадии репродукции на разных этапах изоморфного деления (рисунки 2, 3), что свидетельствует о тенденции к интенсификации развития и размножения облученных культур.

Полученные данные согласуются с результатами культуральных исследований, которые свидетельствуют об ускорении репродуктивной активности облученных дозами 25 – 250 Р *Mycobacterium bovis* и атипичных.

Таким образом, результаты исследований показали, что микроструктура микобактерий после облучения малыми (стимулирующими) дозами радиации не изменяется, а репродуктивная активность возрастает.

Заключение. Проведенными исследованиями установлено, что ультраструктура *Mycobacterium bovis* и атипичных нефотохромогенных (*Mycobacterium intracellulare*) после облучения дозами γ -излучения 0,00645–0,0645 Кл/кг (25–250 Р) не изменяется. В препаратах из культур *M. bovis* и *M. intracellulare* после облучения этими дозами отмечается повышенная репродуктивная активность, преобладают микробные клетки в процессе деления, а при культуральных исследованиях отмечается ускорение роста *M. bovis*, что свидетельствует о стимулирующем действии радиации на

репродуктивную активность микобактерий.

При изучении препаратов из культур *M. bovis* отмечали, что микобактерии имеют вид коротких или умеренно длинных овоидных палочек. Отмечается значительный полиморфизм микобактерий. Цитоплазма микобактериальных клеток заполнена большим количеством осmioфильных гранул [Г]. В цитоплазме заметна зернистость (зерна Муха) [ЗМ]. Большие зерна расположены, как правило, ближе к полюсам клетки. В некоторых препаратах заметны клетки с перетяжками и межклеточными ретикулярными тяжами. На поперечных и продольных срезах в некоторых микробных клетках виден нуклеоид (ядерная субстанция) [Нк] на разных стадиях развития и деления.

Проведенными исследованиями установлено, что облученные стерилизующими дозами γ -излучения (154,8–206,4 Кг/кг (600 тыс.–800 тыс. Р) микобактерии бычьего вида и атипичные приобретают дегенеративные изменения, которые приводят к прекращению их репродуктивной активности.

Литература. 1. Кассич, Ю. Досягнення науки і практики в застосуванні методу алергічної діагностики туберкульозу великої рогатої худоби / Ю. Я. Кассич, П. П. Фукс, А. І. Завгородній // *Ветеринарна медицина України*. – 1999. – № 9. – С. – 18. 2. Туберкулез животных и меры борьбы с ним / Ю. Я. Кассич, А. Т. Борзяк, А. Ф. Кочмарский [и др.]; Под ред. Ю. Я. Кассича. – Киев : Урожай, 1990. – 304 с. 3. Кассич, В. Ю. Мінливість микобактерій, епізоотологічний моніторинг, засоби і заходи боротьби з туберкульозом тварин в умовах радіаційного впливу : Дис... д-ра вет. наук : 16.00.03. / В. Ю. Кассич. – Харків, 2004. – 408 с. 4. Лазовская, А. Л. Серологическая диагностика туберкулеза крупного рогатого скота / А. Л. Лазовская, В. П. Сафронов, Е. М. Максимова // *Туберкулез крупного рогатого скота и меры борьбы с ним*. – 1986. – С. 90–96. 5. Нуратинов, Р. А. Изучение причин парааллергии к туберкулину / Р. А. Нуратинов, И. В. Эфендиев // *ЖМЭИ*. – 2001. – № 1. – С. 50–53. 6. Васин, А. В. К вопросу о влиянии внешних факторов на аллергическое состояние при туберкулезе крупного рогатого скота / А. В. Васин // *Ветеринария*. – 1951. – № 12. – С. 29–30. 7. Клемпарская, Н. Н. Аллергия и радиация / Н. Н. Клемпарская, Г. М. Львицына, Г. А. Шальнова. – Москва: Медицина, 1968. – 280 с. 8. Пасиешвили, Л. М. Влияние малых доз радиации на организм человека и функциональное состояние органов пищеварения / Л. М. Пасиешвили // *Международный медицинский журнал*. – 1997. – Том 3, № 3. – С. 91–92.

Статья передана в печать 25.02.2016 г.

УДК 636:612.33

МЕХАНИЗМЫ ВСАСЫВАНИЯ КОБАЛЬТА В СОЛЕВОЙ И ХЕЛАТНОЙ ФОРМАХ КИШЕЧНИКОМ ЖВАЧНЫХ В УСЛОВИЯХ IN VITRO

Ковалёнок Ю.К.

УО «Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины»,
г. Витебск, Республика Беларусь

В условиях модельного эксперимента in vitro установлены значимые ($P < 0,001$) различия механизмов кишечного транспорта Co , находящихся в солевых и хелатных формах. Предполагается, что хелатирование Co этилендиаминтетраацетатом приводит к всасыванию элемента по парацеллюлярному пути.

In conditions of a model experiment in vitro significant ($P < 0,001$) differences of mechanism of intestinal transport of Co that were in salted and chelate forms have been stated. It is assumed that chelating of Co by ethylenediaminetetraacetate leads to the absorption of element on paracellular way.

Ключевые слова: кобальт, всасываемость, биодоступность, телята.

Keywords: cobalt, absorption, bioavailability, calves.

Введение. Проблема обеспеченности животных микроэлементами и связанные с этим болезни продолжают оставаться одной из актуальнейших проблем в современном животноводстве [3, 5, 6]. В последнее время отечественные и зарубежные ученые активно работают над конструированием и изучением свойств элементоорганических препаратов нового поколения, в которых минеральные вещества содержатся в виде комплекса с веществами, подобными природным носителям микроэлементов [2, 6, 9, 10, 12]. В данном контексте особый интерес представляют хелатные соединения – внутрикомплексные вещества, содержащие циклические группировки органических молекул.

К настоящему времени доказано, что микроэлементные препараты второго поколения обладают более высоким потенциалом усвояемости в сравнении с солями. Большинство ученых [1, 2, 4, 8] при этом констатируют значительный специфический эффект хелатных форм микроэлементов для лечения и профилактики микроэлементозов у животных и птиц. Вместе с тем, системных исследований механизмов, обеспечивающих данный процесс в информационном пространстве, нами не обнаружено. Следует отметить, что имеются сообщения [2, 8, 11], указывающие на гипотетическую опасность подобных соединений ввиду возможных социальных последствий, противоречивости позиций всасываемости микроэлементов из соединений хелатного типа и сорбции лигандами других,