

УДК 619:616+591+636

**АНАЛИЗ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ СВОЙСТВ АНТИГЕНОВ
НЕКОТОРЫХ ГЕЛЬМИНТОВ КАК ТЕХНОЛОГИЯ
ПАЗАРИТОЛОГИЧЕСКОЙ МЕТАБОЛОМИКИ**

^{1,4}Мартусевич А.К., ²Жданова О.Б., ³Хайдарова А.А., ³Бережко В.К., ³Написанова Л.А.

¹ФГБУ «Приволжский федеральный медицинский исследовательский центр»

Минздрава России, Нижний Новгород;

²ГБОУ ВПО «Кировская государственная медицинская академия» Минздрава России, Киров;

³Всероссийский научно-исследовательский институт фундаментальной и прикладной паразитологии животных и растений имени К.И. Скрабина, Москва;

⁴Ассоциация российских озонотерапевтов, Нижний Новгород, e-mail: cryst-mart@yandex.ru

Целью исследования служила оценка особенностей дегидратированных антигенов некоторых распространенных гельминтов (трихинелл, сетарий, токсокар). Исследованы соматические антигены нематод (трихинелл, сетарий и токсокар). Для получения антигена трихинелл провели экспериментальное заражение белых беспородных крыс (15 животных) личинками *T. spiralis* в дозе 2000 лич./животное. Антигены из сетарий и токсокар получены по методике ВИГИС (Москва). Исследовали кристаллогенную активность антигенов по собственной методике. Для выполнения качественно-количественной оценки результатов собственной кристаллизации слюны (морфометрия фаций) применяли следующие критерии: индекс структурности, кристаллизруемость, степень деструкции фации и выраженность краевой белковой зоны. Установлено, что кристаллогенные свойства антигенов различных гельминтов существенно варьируют. При этом их прокристаллогенная активность убывает в ряду «токсокары – сетарии – трихинеллы», что проявляется на основании анализа кристаллоскопических фаций антигенов указанных гельминтов по всем использованным критериям. Это позволяет говорить о возможности разработки технологии метаболической дифференциации антигенов по их способности к собственной структуризации на стекле.

Ключевые слова: антигены, кристаллизация, дифференциация, токсокары, трихинеллы, сетарии

**ANALYSIS OF PHYSICAL AND CHEMICAL PROPERTIES OF ANTIGENS OF SOME
HELMINTS AS A TECHNOLOGY OF PARASITOLOGICAL METABOLOMICS**

^{1,4}Martusevich A.K., ²Zhdanova O.B., ³Khaydarova A.A., ³Berezhko V.K., ³Napisanova L.A.

¹Volga Federal Medical Research Center, Nizhny Novgorod;

²Kirov State Medical Academy, Kirov;

³All-Russian Research Institute of Fundamental and Applied Parasitology of Animals and Plants named after K.I. Skryabin, Moscow;

⁴Association of russian ozone therapists, Nizhny Novgorod, e-mail: cryst-mart@yandex.ru

The aim of this paper is estimation of dehydration of antigens of some helminths (trichinella, setaria, toxocara). Somatic antigens of these nematodes are studied. For trichinellas antigen getting the special experiments were executed on 15 rats with invasion (2000 /animals). Setaria and toxocara antigens are getting with own technology. Crystallogenic properties of these antigens were investigated with our method of classic crystalloscopy. For facias morphometry we used some special criterias, including structure index, crystallizability, facia destruction degree, and clarity of marginal belt. It is stated that crystallogenic properties of investigated antigens is differed significantly. Crystallogenic activity decreased in the number of “toxocara – setaria – trichinella”. It is shown by analysis of crystalloscopic facias of antigens with all criterias. It is usefull for differentiation of antigens on its dehydration structurization.

Keywords: antigens, crystallization, differentiation, toxocara, trichinella, setaria

Термин «Metabolomics» впервые был опубликован в 1998 г. в статье «Effect of Slow Growth on Metabolism of Escherichia coli, as Revealed by Global Metabolite Pool (metabolom) Analysis» [16]. Согласно существующим представлениям, метабомика – это «систематическое изучение уникальных химических «отпечатков пальцев», специфичных для процессов, протекающих в живых клетках» [10]. Метаболом представляет собой совокупность всех метаболитов, являющихся конечным продуктом

обмена веществ в клетке, ткани, органе или организме [12]. В то время как данные об экспрессии мРНК генов и данные протеомного анализа не раскрывают полностью того, что может происходить в клетке, метаболические профили могут дать мгновенный «снимок» физиологических процессов в ней [15]. Токсические эффекты, генетические и соматические заболевания могут проявляться нарушением синтеза некоторых белков, приводящим к изменению управления биохимическими процессами,

что в свою очередь отражается на соотношении концентраций многих эндогенных веществ в потоках биологических жидкостей [6, 10, 15]. На сегодняшний день метаболизма все ещё остается «новой» областью исследований [12]. Дальнейший прогресс в этой области зависит от многих факторов, в том числе от развития технической базы аналитических методов. С учетом наличия подобной ситуации неслучаен интерес к инновационным методам, которые способны отражать метаболический профиль биологических жидкостей. К таковым, в частности, относятся технологии исследования кристаллогенных свойств биосред [4].

К настоящему времени клинические проявления нематодозов изучены достаточно полно, предложены новейшие методы диагностики этих заболеваний, однако глобальные экологические изменения последних десятилетий, широкое применение антибактериальных, иммуностропных и прочих лекарственных средств и ряд других факторов изменили клиническую картину данных паразитарных инвазий [5, 8, 9, 11]. На этом основании нематодозы, несмотря на их распространенность, остаются на сегодняшний день одной из самых плохо диагностируемых патологий [8]. В связи с этим актуальными остаются поиски методов ранней, качественной, информативно-специфической верификации глистно-паразитарной инвазии с целью проведения своевременного лечения методами, обладающими минимальным количеством побочных эффектов и высокой эффективностью в отношении паразитарных инвазий у человека и животных, для чего необходимо иметь арсенал антигенов всех гельминтов [8, 13].

Целью исследования служила оценка особенностей дегидратированных антигенов некоторых распространенных гельминтов (трихинелл, сетарий, токсокар).

Материалы и методы исследования

Исследованы соматические антигены нематод (трихинелл, сетарий и токсокар). Для получения антигена трихинелл провели экспериментальное заражение белых беспородных крыс (15 животных) личинками *T. spiralis* в дозе 2000 лич./животное [1, 5, 7]. Из тушек крыс готовили фарш, который переваривали в искусственном желудочном соке (пептолиз) по ускоренной методике в аппарате АВТ (аппарат для групповой экспертизы свинины на трихинеллез) в течение 30 минут при непрерывном помешивании. Использовали личинки 45–50-дневного возраста. Выделенных личинок тщательно отмывали физиологическим раствором, затем 2 раза стерильным физиологическим раствором и переносили в стерильный стакан. Дальнейшую отмывку проводили в стерильных условиях в боксе. Отмывали 4 раза раствором Хенкса с добавлением 1000 Ед/мл пени-

циллина и 1 мг/мл стрептомицина и 1 раз физиологическим раствором. Экспозиция отстаивания после каждой отмывки составляла 15–20 минут, что позволяло избавиться от нежизнеспособных особей. Отмытых личинок помещали в чашки Петри. Антиген из трихинелл получали по методу Magat в модификации ВИГИС – фракционированием соматических экстрактов гельминтов [2, 3]. Через 40–45 дней получали мышечную массу крыс. Переваривание в искусственном желудочном соке проводили в течение 4 часов при 39–40°C, периодически перемешивая содержимое. Полученные личинки отмывали физраствором, проверяли их жизнеспособность и замораживали для накопления и дальнейшего использования при температуре –18°C. Приготовление соматических экстрактов гельминтов путем измельчения, гомогенизации, многократного замораживания и оттаивания с последующим экстрагированием белков в фосфатном буферном растворе рН 7,2–7,4 проводилось при температуре 4°C при постоянном перемешивании на магнитной мешалке в течение 24–48 часов. Полученная гомогенная масса была подвергнута центрифугированию при 15 тыс. об/мин на холоде в течение 15–20 мин. Надосадочная жидкость – экстракт – использовался в качестве антигена. Фракционирование белковых антигенов-экстрактов из половозрелых *T. spiralis* проводили методом гель-фильтрации на колонке с сефадексом [2, 7].

Антиген из сетарий получен по способу Бережко В.К. с соавт. [2, 7] и включает следующие процессы: проведение гомогенизации половозрелых гельминтов *Setaria labiato-papillosa* вручную на холоде, экстрагирование белков гомогената в фосфатно-солевом буфере рН 7,2–7,4 в соотношении 1:10 в течение 48 часов при +4°C на магнитной мешалке, центрифугирование гомогената и отбор надосадочной жидкости при 15 тыс. об/мин и +4°C в течение 20 минут, надосадочную жидкость – экстракт дополнительно очищают гелефильтрацией на колонке с сорбентом Superose 12 Prep Grade и скоростью потока натрий-фосфатного буфера (рН 6,0) – 30 мл/ч, с последующим отбором антигено-активных фракций посредством иммуноферментной реакции с помощью положительных и отрицательных при диروفилариозе собак референс-сывороток.

Исследовали кристаллогенную активность антигенов по следующей методике [5, 136 14]: отбирали пробу, которую наносили на предметное стекло, в объеме 50–100 мкл и проводили дегидратацию препарата в потоке теплого воздуха при температуре 40–50°C и влажности 20–30% в течение 15–20 минут в горизонтальном положении. Далее с помощью цифровой фотокамеры высокого разрешения получали цифровое изображение препарата, которое переносили в память компьютера и изучали основные структурообразующие элементы фаций.

Для выполнения качественно-количественной оценки результатов собственной кристаллизации слюны (морфометрия фаций) применяли следующие критерии: индекс структурности, кристаллизуемость, степень деструкции фации и выраженность краевой белковой зоны [5, 14].

Статистическую обработку данных производили с помощью Statistica 6.0.

Результаты исследования и их обсуждение

Картины собственной структуризации антигенов некоторых нематод представле-

ны на рис. 1–3. Анализ кристаллогенных свойств антигенов различных гельминтов позволяет верифицировать их существен-

ные различия, причем они находят отражение как в морфологии центральной, так и краевой зоны микропрепарата.

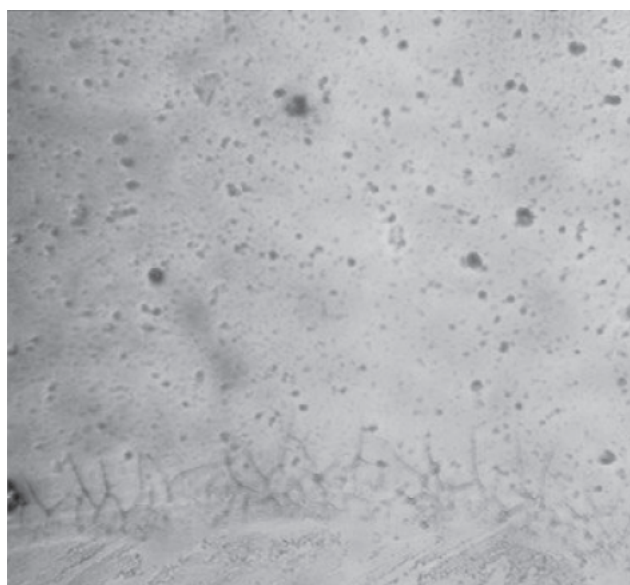


Рис. 1. Морфологическая картина фации дегидратированного фракционированного антигена, приготовленного из трихинелл



Рис. 2. Морфологическая картина фации дегидратированного фракционированного антигена, приготовленного из ситарий

Так, наименее выраженной кристаллогенной активностью обладает антиген трихинелл (рис. 1). Для его фаций характерно формирование немногочисленных одиночно-кристаллических элементов в центральной зоне в сочетании с умеренными признаками дендритообразования в краевой зоне высушенного образца.

В дегидратированных препаратах ситарий наблюдали более активную структуризацию, что в первую очередь касалось стимуляции процессов дендритогенеза в краевой зоне фации (рис. 2). Также регистрировали активацию кристаллообразования и в центральной зоне микропрепарата антигена.

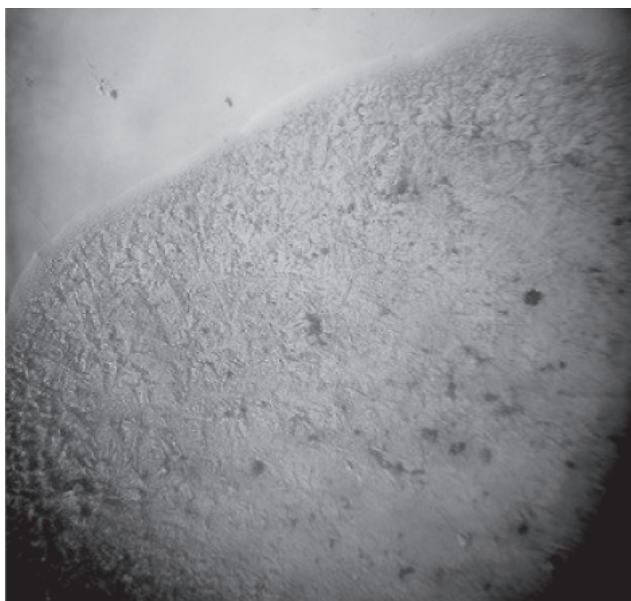


Рис. 3. Морфологическая картина фации дегидратированного фракционированного антигена, приготовленного из токсокар

Паттерн собственной кристаллизации эталонных антигенов

Показатель	Виды паразитарных антигенов		
	Антиген из трихинелл	Антиген из сетарий	Антиген из токсокар
Индекс структурности	$0,7 \pm 0,2^*$	$1,4 \pm 0,3$	$2,9 \pm 0,2^*$
Кристаллизуемость	$1,4 \pm 0,2$	$1,1 \pm 0,3$	$2,8 \pm 0,2^*$
Степень деструкции фации	$1,8 \pm 0,3^*$	$1,1 \pm 0,2$	$0,6 \pm 0,3^*$
Выраженность краевой зоны	$1,6 \pm 0,2^*$	$2,3 \pm 0,3$	$1,2 \pm 0,2^*$

Примечание. * – $p < 0,05$ по сравнению с уровнем показателя, характерным для антигена сетарий.

Наиболее значимая дендритизация кристаллоскопической фации отмечена в случае проведения дегидратации антигена токсокар (рис. 3). Эта тенденция особенно выражено проявлялась в краевой зоне микропрепарата, однако и в центральной его части имело место формирование поликристаллических структурных элементов.

На основании подсчета четырех указанных выше показателей сформирован паттерн их значений (таблица). Установлено, что различия в характере собственной кристаллизации рассматриваемых антигенов проявляются и при морфометрическом анализе кристаллограмм, причем все использованные показатели закономерно изменяются в ряду «токсокары – сетарии – трихинеллы».

Заключение

Установлено, что кристаллогенные свойства антигенов различных гельминтов

существенно варьируют. При этом их прокристаллогенная активность убывает в ряду «токсокары – сетарии – трихинеллы», что проявляется на основании анализа кристаллоскопических фаций антигенов указанных гельминтов по всем использованным критериям. Это позволяет говорить о возможности разработки технологии метаболической дифференциации антигенов по их способности к собственной структуризации.

Работа поддержана грантом РФФИ № 14-34-50-405 «Научно-методические основы разработки методов специфической профилактики трихинеллеза».

Список литературы

1. Бекиш О.Я., Бурак И.И. Особенности патогенеза трихинеллеза в зависимости от интенсивности заражения // Паразитоценозы диких и домашних животных. – Минск, 1984. – С. 56–58.
2. Бенедиктов И.И., Липатова Л.Н. Получение, свойства и использование моноклональных антител для очистки

диагностических антигенов трихинелл // Матер. докл. VI научн. конф. по проблеме трихинеллеза человека и животных. М., 1992. – С. 36–38.

3. Бережко В.К. Динамика развития гиперчувствительности немедленного типа и уровня сывороточных иммуноглобулинов при экспериментальном трихинеллезе: непрягая реакция дегрануляции тучных клеток, реакция пассивной кожной анафилаксии // Мат. докл. 7 научной конф. по пробл. трихинеллеза человека и животных. – М., 1996. – С. 39–42.

4. Мартусевич А. К. Кристаллографический анализ биосубстратов как новый метод клинической протеомики и метаболомики // Клиническая лабораторная диагностика. – 2007. – № 9. – С. 4–5.

5. Мартусевич А.К., Жданова О.Б. Исследование зависимости кристаллогенной активности биосреды от интенсивности инвазии *Trichinella spiralis* // Российский паразитологический журнал. – 2013. – № 2. – С. 78–85.

6. Машко С.В. с соавт. Использование метаболической регуляции для оптимизации экспрессии генов – новое направление развитие биотехнологии XXI века // Биотехнология. – 2002. – № 4. – С. 3–14.

7. Написанова Л.А. ELISA и dot-ELISA в динамике экспериментального трихинеллеза свиней // Мат. докл. 7-й научной конф. по проблеме трихинеллеза человека и животных. – М., 1996. – С. 48–49.

8. Одинцева Е.В. Современные особенности диагностики и лечения глистно-паразитарных инвазий у детей: автореф. дис. ... канд. мед наук. – М., 2009. – 23 с.

9. Успенский А.В. Некоторые особенности распространения трихинеллеза в России // Мат. докл. 8. научной конф. по пробл. трихинеллеза человека и животных. – М., 2000. – С. 68–72.

10. Davis C.D., Hord N.G. Nutritional «omics» technologies for elucidating the role(s) of bioactive food components in colon cancer prevention // J. Nutr. – 2005. – Vol. 135, N 11. – P. 2694–2697.

11. Gamble H.R., Rapi Ć.D., Marinculic. A., Murrell K.D. Evaluation on excretory-secretory antigens for the serodiagnosis of swine trichinellosis // Vet. Parasitol. – 1988. – Vol. 30, № 2. – P. 131–137.

12. Jordan K.W. et al. Metabolomic characterization of human rectal adenocarcinoma with intact tissue magnetic resonance spectroscopy // Dis. Colon Rectum. – 2009. – Vol. 52, № 3. – P. 520–525.

13. Martusevich A.K., Grishina A.A., Bochkareva A.V. Crystallodiagnosics of some animals' helminthosis // Asian Pacific Journal of Tropical Medicine. – 2010. – Vol. 3, № 3. – P. 176–179.

14. Martusevich A.K., Kamakin N.F. Crystallography of biological fluid as a method of evaluating its physicochemical characteristics // Bulletin of Experimental Biology and Medicine. – 2007. – Vol. 143, № 3. – P. 385–388.

15. Novotny M.V., Soini H.A., Mechref Y. Biochemical individuality reflected in chromatographic, electrophoretic and mass-spectrometric profiles // J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci. – 2008. – Vol. 866, №1–2. – P. 26–47.

16. Tweeddale H., Notley-McRobb L., Ferenci T. Effect of slow growth on metabolism of *Escherichia coli*, as revealed by global metabolite pool («metabolome») analysis // J. Bacteriol. – 1998. – Vol. 180, N 19. – P. 5109–5116.

References

1. Bekish O.Ya., Burak I.I., *Parazitocenosis dikih I domashnih zhivotnyh – Parasitocenoses of wild and domestic animals*, Minsk, 1984, pp. 56–58.

2. Benediktov I.I., Lipatova L.N., *Mater. dokl. VI nauchn. konf. po probleme trihinelleza cheliveka i zhivityh – Proc. of reports of VI scientific conf. on human and animals trichinellosis*, Moscow, 1992, pp. 36–38.

3. Berezko V.K., *Mater. dokl. VII nauchn. konf. po probleme trihinelleza cheliveka i zhivityh – Proc. of reports of VII scientific conf. on human and animals trichinellosis*, Moscow, 1996, pp. 39–42.

4. Martusevich A.K., *Klinicheskaja laboratornaja diagnostika – Clinical laboratory diagnostics*, 2007, no. 9, pp. 4–5.

5. Martusevich A.K., Zhdanova O.B., *Rossiyskiy parazitologicheskij jurnal – Russian parasitological journal*, 2013, no. 2, pp. 78–85.

6. Mashko S.V. et al., *Biotechnologiya – Biotechnology*, 2002, no. 4, pp. 3–14.

7. Napisnava L.A., *Mater. dokl. VII nauchn. konf. po probleme trihinelleza cheliveka i zhivityh – Proc. of reports of VII scientific conf. on human and animals trichinellosis*, Moscow, 1996, pp. 48–49.

8. Odintsova E.V., *Sovremennye osobennosti diagnostiki i lecheniya glistni-parazitarnyh invaziy u detei [Modern species of diagnostics and treatment of parasitological invasions in children]*. Thesis of dissert., Moscow, 2009.

9. Uspenskiy A.V., *Mater. dokl. VIII nauchn. konf. po probleme trihinelleza cheliveka i zhivityh – Proc. of reports of VIII scientific conf. on human and animals trichinellosis*, Moscow, 2000, pp. 68–72.

10. Davis C.D., Hord N.G., *J. Nutr.*, 2005, vol. 135, no. 11, pp. 2694–2697.

11. Gamble H.R., Rapi Ć.D., Marinculic. A., Murrell K.D. *Vet. Parasitol.*, 1988, vol. 30, no. 2, pp. 131–137.

12. Jordan K.W. et al., *Dis. Colon Rectum.*, 2009, vol. 52, no. 3, pp. 520–525.

13. Martusevich A.K., Grishina A.A., Bochkareva A.V., *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 2010, vol. 3, no. 3, pp. 176–179.

14. Martusevich A.K., Kamakin N.F., *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 2007, vol. 143, no. 3, pp. 385–388.

15. Novotny M.V., Soini H.A., Mechref Y., *J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.*, 2008, vol. 866, no. 1–2, pp. 26–47.

16. Tweeddale H., Notley-McRobb L., Ferenci T., *J. Bacteriol.*, 1998., vol. 180, no. 19, pp. 5109–5116.

Рецензенты:

Колосов А.Е., д.м.н., профессор, зав. кафедрой патологической анатомии с секционным курсом, ГБОУ ВПО «Кировская государственная медицинская академия Минздрава России», г. Киров;

Абдуллин Т.Г., д.м.н., профессор кафедры гистологии, эмбриологии и цитологии, ГБОУ ВПО «Кировская государственная медицинская академия Минздрава России», г. Киров.

Работа поступила в редакцию 26.12.2014.