

NEWS

OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE REPUBLIC OF KAZAKHSTAN

SERIES OF BIOLOGICAL AND MEDICAL

ISSN 2224-5308

Volume 2, Number 308 (2015), 82 – 87

METHODS OF PREPARATION OF THE PET RABBIT IMMUNE SERUM REVELATION TOXOPLASMA

R. A. Abildaeva, A. D. Dauilbai, G. S. Rysbaeva

M. Auezov named South-Kazakhstan State University, Shymkent, Kazakhstan.

E-mail: rozita.71@mail.ru

Key words: invasion, advanty ultrasound, T and B lymphocyte immunoglobulins.

Abstract. The results of our experiments showed that the prior use of adjuvant increases the titer of the immune serum of Toxoplasma. Strong effect of adjuvant on the synthesis of antibodies during immunization by dezintegratom of toxoplasma and increasing of animal resistance by adjuvant in immunization with toxic toxoplasma were found. Specifically, several domestic rabbits were died upon immunization of toxic toxoplasma without the use of adjuvants, but using of adjuvant didn't show negative influence.

ӨОЖ 619:616.96

ТОКСОПЛАЗМАНЫҢ ИММУНДЫ ҚАН САРЫСУЫН ҮЙ ҚОЯНЫНАН АЛУ ЖОЛДАРЫ

Р. А. Абилдаева, А. Д. Дауылбай, Г. С. Рысбаева

М. Әуезов атындағы ОҚМУ, Шымкент, Қазақстан

Тірек сөздер: инвазия, адъвантты, ультрадыбыс, Т және В лимфоциттер, иммуноглобулин.

Аннотация. Мақалада токсоплазманың иммунды қан сарысуын үй қоянынан алу жолдары қарастырылған. Токсоплазма паразиті табиғатта тағы аңдар мен үй жануарлары және адамдарда кең таралған. Токсоплазмаға бейімділігіне қарай жануарлар бірнеше топқа бөлінетіндігі мен токсоплазманың кең географиялық аймақтарда таралуында құстардың маңызы зор. Жыл құстары бір материктен екінші материкке ұшу арқылы токсоплазманы тарататыны анықталған. Токсоплазманың табиғатта сақталуына үй жануарларының да маңызы зор. Жүргізілген зерттеулер үй жануарларында токсоплазмоз кеңінен таралғанын көрсетеді.

Біздің 1975 жылдан бері токсоплазмозды зерттеудегі ғылыми жұмыстарымыз негізінен лабораториялық жануарлар пайдаланылды. Токсоплазма антигенін алу және оны тексеру, токсоплазмалық иммунды сарысу алу және оны пайдалану т.б. көптеген жұмыстардың негізі ақ тышқандар мен үй қояндарында жүргізілді. Зерттеу жұмыстарына пайдаланылатын қояндарды, алдын ала токсоплазмозға тексергенде 15-30% оң көрсеткіш көрсететіні анықталды. Токсоплазмамен жұқтырылған буаз аналық қояндардың 80-90%-ы іш тастайды. Кейде іш тастамай туған көжектер әлжуаз болып, көбісі өліп қалады. Токсоплазмоз қояндарда алғашқы кезде жіті түрде өтеді. Ауырған қояндардың жүндері үрпиіп, тамаққа тәбеті болмай, бүрісіп бұйығып отырады. Аса жіті токсоплазмозбен ауырған қояндар 4-5 күнде өледі. Жіті токсоплазмозбен ауырған қояндардың 34-40%-ы 5-10 күнде өліп, қалғандары біртіндеп оңалады. Өлген қояндардың барлық ішкі мүшелерінен; бауыр, талақ, бүйрек, жүрек, ми ұлпаларынан микроскопиялық әдіспен токсоплазманы байқауға болады. Сонымен қатар биологиялық әдіспен бөліп алуға болады. Токсоплазма штамдарын ұстау әсіресе оны тазалау үшін лабораториялық жануарлардан қоян тиімді болып саналады.

Токсоплазманың жоғарғы мөлшердегі антиденесі бір иммунды қан сарысуын алу үшін қалыптасқан тәсілдерді қолдануға болмайды. Микроб, паразит т.б. көптеген ағзалар антигендердің қасиеттері әртүрлі болып келетіндіктен, әрқайсысының иммундеу тәсілінің алдын ала зерттеу керек. Бұл үшін: жануарлардың түрі, антиген егу жері, оны енгізу түрі (тері астына, бұлшық етке, т.б.) адьювантты қолдану тәсілі, антигенді алу тәсілі, антигеннің физика-химиялық қасиеті, қан алу мерзімі, т.б. көптеген жағдайлар анықталу қажет.

Иммундеу тәсілін зерттеу мақсатында біз үй қояны мен қойға салыстырмалы түрде біршеше тәжірибелер жүргіздік [1].

1 тәсіл. Иммундеу үшін ультрадыбыспен әсер ету арқылы алынған токсоплазма дезинтеграты (токсоплазма антигені) және сол антигеннен изоондыбөлшектеу арқылы бөлініп алынған паразиттің өзіне тән компоненті алынған.

Иммунделінетін үй қояндары екі топқа бөлінді. Бірінші топ қояндарын үш аптаға созылған сұлбе арқылы токсоплазма дезинтегратымен иммунделді. Ол үшін бірінші аптада антиген көк қан тамырына 0,5 мл енгізді. Сонымен қатар құрсақ тері астына 0,2 мл антигеннің Фрейнд адьювантымен бірдей мөлшердегі қоспасы егілді. 4 күннен кейін көк қан тамырына 0,5 мл антиген жіберілді. Келесі екінші және үшінші аптада иммундеу осы бірінші апта сұлбесімен жүргізілді.

Иммундеу 40 күн үзілістен кейін қайталанды. Ол үшін антиген 3 ретегілді.

Бірінші рет құрсақ қаймағының тері астына антигеннің Фрейнд адьюванты мен қоспасынан 0,2 мл егілді.

Екінші және үшінші рет антигеннің 0,5 мл 3-4 күн аралатып көктамырға жіберілді.

Екінші топ қояндары токсоплазманың өзіне тән компоненті арқылы, алғашқы сұлбемен иммунделді. Антигеннің көкқантамырына жіберілген мөлшері 0,75 мл, тері астына 1,2 мл (адьювантпен қоспасы). Екі топтағы үйқояндарын иммундеу үшін пайдаланылған антигендердегі ақуыз мөлшері 1 мг/мл.

Үшінші топ қояндары уытты токсоплазма рН шамасымен иммунделді. Ол үшін антиген 0,2 мл мөлшерде екі рет, аралығына 10 күн салып егіледі. 30 күн өткен соң тағы да 0,2 мл мөлшерде екі рет аралығына 7 күн салып егіледі.

Егілген антигендердегі токсоплазма саны 7×40 үлкейткішпен қарағанда 1-2 болу керек.

Төртінші топ үйқояндарын иммундеу үшін топ қояндарының сұлбесімен жүргізіледі. Бірақ уытты токсоплазманы егу алдында 2-3 күн бұрын үй қояндарының лимфа бездерінің аймағына 0,2 мл антигеннің Фрейнд адьювантымен қоспасы жіберіледі.

1-кесте – Токсоплазманың антигендерімен иммундеу сұлбесіне байланысты антидене мөлшерін анықтау

Жануар топтары	Антиденетитрі						
	1	7	14	21	28	35	42
1 топ							
1 кезең		1:20	1:80	1:160	1:320	1:640	1:640
2 кезең	1:40	1:320	1:640	1:1280			
2 топ							
1 кезең		1:20	1:40	1:80	1:160	1:320	1:640
2 кезең	1:40	1:320	1:640	1:1280			
3 топ							
1 кезең		1:10	1:40	1:160	1:320	1:640	
2 кезең	1:80	1:320	1:1280	1:2560			
4 топ							
1 кезең		1:80	1:160	1:320	1:640	1:1280	
2 кезең	1:80	1:320	1:1280	1:5120			

Түсініктеме: кестеде антидененің орта геометриялық титрі көрсетілген.

Зерттеу нәтижесі: бірінші және екінші тәжірибе мінде үйқояндарының қанындағы токсоплазмалық антидене мөлшері 1:640 және 1:320 титрге көтерілгенін көрсетті (1-кесте). Ал үшінші және төртінші топ жануарларының қанындағы токсоплазмалық антидене 1:1280 және 1:2560 титрге жетті. Жоғарғы көрсеткіш токсоплазма дезинтегратын қолданғанда да алынды.

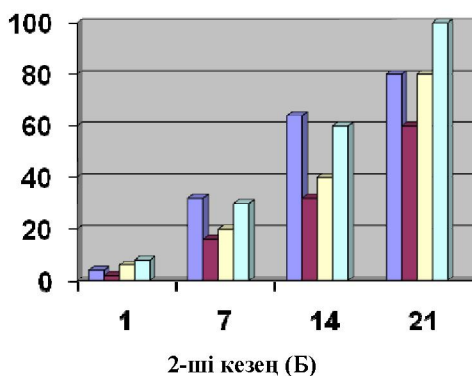
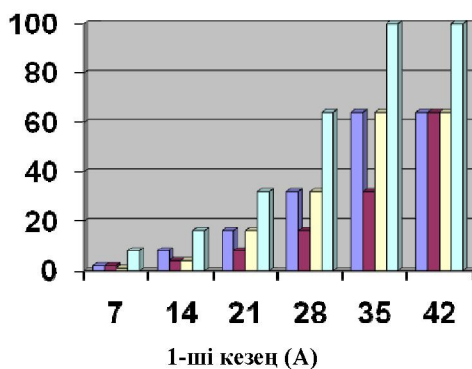
Антиген әсері күрделі, ол антигеннің физика-химиялық қасиетін өзгерту арқылы оның ағзаға әсерін күшейтеді. Олар ағзаның өзіне әсер ету арқылы оның қорғаныш қасиеттерін күшейтеді. Сондықтан адьювант арқылы қозған иммунологиялық реакция, антиген әсерін күшейтіп, антидене синтезін жоғары дәрежеде жүргізеді. (П.Ф. Здрадовский, 1961; А.А. Воробьев, Н.Н. Васильев, 1969, Я.Р. Коваленко, 1970).

Біздің тәжірибемізде алынған нәтиже алдынала адьювант қолдану токсоплазманың иммунды сарысуының титрін жоғары көтергенін көрсетті. Егер токсоплазма дезинтегратымен иммундеуде адьювант антидене синтездеуіне жоғары әсер етсе, ал уытты токсоплазмамен иммундеуде адьювант жануар ағзасының төзімділігін күшейткені байқалды. Атап айтқанда, адьювантты қолданбай уытты токсоплазмамен иммундеу кезінде ұйқояндарының біразы өлген болса, адьювант қолданғанымызда бірде-бір қояншығын болған жоқ.

Иммунизация жүргізу барысында антидене синтездеуіне антигеннің егу мөлшерінің де маңызы үлкен. Антигеннің мөлшері көбейтілген сайын, иммунологиялық реакция әсері өсе береді, яғни антидене синтездеу жоғарылайды. Бірақ бұл заңдылық тұрақты болмайды. Антиген белгілі бір мөлшерге дейін иммунологиялық реакцияны күшейтеді, ал ол мөлшерде насып кеткен жағдайда керісінше иммунологиялық реакция бәсеңдейді [2].

Токсоплазма антигеннің ең жоғарғы әсер ететін мөлшері оның құрамындағы ақ уыздың мөлшері 1 мг/мл жеткенде болады. Онан жоғарылап кеткенде, антидене титрі төмендейтіні байқалады (1-сызба). Бұл құбылысты көп ғалымдар антигеннің шамадан тыс жануар ағзасына әсер ету арқылы иммунологиялық реакцияны тежеуі деп түсіндіреді. Бұндай құбылыс бактериямен иммундегенде де байқалады (А.А. Зильбер, 1958; П.Ф. Здрадовский, 1963).

Біздің жүргізген зерттеуіміздің нәтижесінде токсоплазмалық антидене алуда, антигенді бір жерге барлық мөлшерін салғаннан әр жерге сол өлшемін бөліп салғанда антидене титрі жоғары болатыны анықталды. Ең тиімді иммундеу токсоплазма антигендерін лимфа бездері бар жерлерге бөліп салу болып табылады. Лимфа бездерінің жанына егу арқылы токсоплазма антигенінің иммунологиялық реакциянық оздыру қасиетін күшейту, оның жануардың иммундық жүйесіне тікелей әсер етуіне байланысты болуында. Иммундық жүйеге антигеннің физика-химиялық қасиетінің әсері өзгеше.

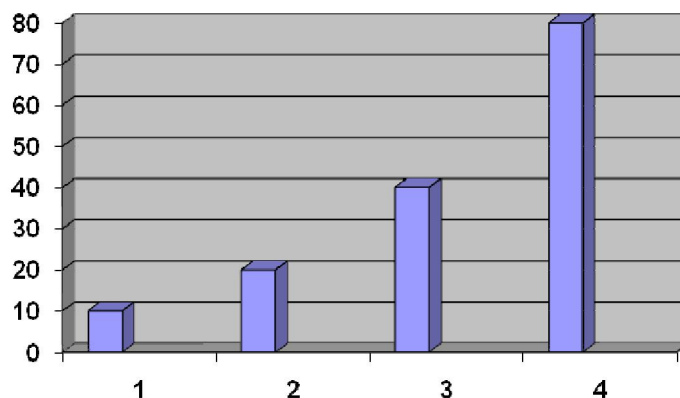


1-сызба – Токсоплазма антигенін егу мөлшерімен антидене түзілуінің байланысын зерттеу

Иммунизация кезінде жоғары дәрежедегі иммунды сарысу алуда антигеннің жануар ағзасының егілетін жерінің де маңызы үлкен. Бактериямен жүргізген зерттеулер антигеннің мөлшері бірдей болғанымен, егілудің саны мен жердің маңызы бары анықталған (Л.Н. Фонталин, 1967) [3].

Атап айтқанда ерітілген антигендер жануарлардың егілген жерінің маңайына әсер етсе, біріктірілген антигендер мен бөлшектенбеген бактериялар ауқымды, жайылып таралу арқылы әсер етеді (П.Ф. Здравовский, 1950, 1963; Л.Н. Фонталин, 1967; Г.В. Шумакова, 1961; В.Г. Годованный, 1963). Сондықтан еріген антигендер бұлшық ет арасына, денелі антигендерді тамыр ішіне жіберілгені тиімді деп саналады.

Токсоплазма антиденесін алуда жүргізілген тәжірибеде жоғарғы көрсеткіш антигенді бірнеше жолмен: тері астына, бұлшық етке және тамыр ішіне жіберуде алынды (2-сызба).



Иммундеу әдістері: 1 – антигенді тері астына енгізу; 2 – антигенді бұлшық етке енгізу; 3 – антигенді көкқантанына жіберу; 4 – антигенді бірнеше жолмен: тері астына, бұлшық етке, көкқантанына жіберу.

2-сызба – Токсоплазма антигендері ағзаға енгізу әдістерін салыстырмалы зерттеу

Егер тері астына екенде токсоплазмалық антидененің титрі 1:80-1:160 бұлшық етке егуде 1:160-1:320, тамыр ішіне салғанда 1:320-1:640, ал осы үш түрлі әдіспен екенде 1:2650-1:5120 титрге жетті (А. Халилаев, 1982).

Токсоплазма антигендерімен иммундеу олардың бірінші кезеңінде антидене синтезделгенін байқадық. Токсоплазмалық антидененің алғашқы индуктивті кезеңі 3-5 күнге созылды. Яғни, токсоплазма антигені енгеннен кейін жануар ағзасында алғашқы антиденелер пайда болуының ұзақтығы 3-5 күнге созылады екен. Осы уақыттан бастап антидене титрі бірден көбейе бастады. Иммундеудің 21-28 күндері антидене жоғарғы титріне жетті.

Сонан кейін антидене төмендей бастайды. Осындай заңдылық бактериямен иммундегенде де байқалған (Л.А. Зильбер, 1958; А.А. Воробьев, Л.А. Клюгарев, 1972) [4].

Алғашқы жануар ағзасында жүретін иммунологиялық өзгерісті П.Ф. Здравовский (1973) иммунологиялық қайта құрылу деп атаған. Ол иммундеу аяқталған соң екі-үш аптадан соң басылады. Сондықтан иммундеудің екінші кезеңін осы иммунологиялық қайта құру құбылысы аяқталған соң бастаған дұрыс, токсоплазма антигенін қайта егу үшін керек тізіліс уақыты 30-40 күнге созылуы тиімді. Осы уақыттан басталған иммунизацияның екінші кезеңінде: антидененің синтезі тез көтеріліп, жалпы титрі алғашқы кезеңмен салыстырғанда екі есе жоғары көтерілді.

Жануар және адамқанының сарысуындағы антидене, оның гамма және бета глобулиндеріне байланысты екендігін көптеген ғалымдардың зерттеулерінде анықталған (В.С. Гостев, 1969; Н.С. Незлин, 1961; М.А. Бавичт.б., 1962; Р.С. Шульц т.б., 1963; Х.М. Илимбаев, 1967).

Токсоплазма антиденесі басқа антиденелер сияқты негізінен екі кластан тұрады. Олар иммуноглобулин М және иммуноглобулин С (Е.М. Кузовкин, 1963; О.Г. Полатаева, 1974; С.М. Коновалова, 1979).

Токсоплазма антигенімен иммундегенде алғашқы кезде иммуноглобулин М антиденесі пайда болып, оның ең жоғарғы титрі екінші аптаның аяғына сәйкес келеді. Сонан соң біртіндеп иммуноглобулин С антиденесі синтезделіп иммундеу соңында қансарысуының құрамын егізінен тек осы антиденеден тұрады (2-кесте).

2-кесте – Токсоплазманың иммундық ансарысуындағы иммуноглобулин түрлерінің титрлерін анықтау

№ п/п	Имуноглобулин	Иммундезкүндері						
		5	7	10	14	21	35	42
Антиденетитрі								
а) токсоплазма дезинтегратына қарсы иммунды сарысуы								
1	M+G	1:40	1:80	1:160	1:320	1:640	1:1280	1:1280
2	M	1:40	1:80	1:160	1:160	1:320	1:160	1:20
3	G	1:5	1:10	1:40	1:160	1:320	1:640	1:1280
б) токсоплазманың өзінге тән антигендік компонентіне қарсы иммунды сарысуы								
1	M+G	1:20	1:40	1:80	1:160	1:320	1:640	1:640
2	M	1:20	1:40	1:80	1:80	1:160	1:320	1:20
3	G	1:5	1:10	1:20	1:40	1:640	1:320	1:640
в) вирулентті токсоплазмаға қарсы иммунды сарысуы								
1	M+G	1:10	1:40	1:160	1:320	1:640	1:1280	1:1280
2	M	1:10	1:20	1:80	1:320	1:320	1:320	1:80
3	G		1:10	1:20	1:20			

Қан құрамындағы антиденелер иммуноглобулин, яғни иммундеу кезіндегі синтезделген глобулиндерден тұрады. Сондықтан глобулин фракциясының мөлшерінің көбеюі, қандағы антиденелер титрінің жоғарылауының белгісі. Қорыта айтқанда, қарапайымдылар типіне жататын токсоплазма паразитіне қарсы иммунды қансарысуын алу үшін иммундеуді екі кезеңмен жүргізген тиімді [5, 6].

Токсоплазма антигенін алдымен ерітілген (дезинтеграт) күйінде, кейін уытты жасуша түрінде адьювантпен араластырып салған тиімді. Антиген теріастына және бұлшық етке енгізілгенде, бір жерде салынбай, бірнеше лимфа бездерінің жинақталған жеріне бөліп салу керек. Біз ғылыми жұмыстарымызда: токсоплазманың антиген компоненттерін зерттеу және өзіне тән компоненттерді алу, сондай-ақ токсоплазманың басқа паразиттермен антигендік байланысы т.б. зерттеу жұмыстарымызға керекті жоғарғы дәрежелі иммунды қансарысуын алу үшін төмендегі сұлбені пайдаландық.

Иммундеуге қажетті токсоплазма антигенін бірдей мөлшерде адьювантпен араластырып, тері астына төрт жерге лимфа бездерінің және маңайына салу керек. Екінші және үшінші егуді бұлшық етке және 14 күн егу керек. Төртінші егуді 44-күні қантамыры арқылы жіберілген соң 14-2 күндері жануарларды қансыздандыру керек. Осы сұлбемен алынған токсоплазманың иммунді қансарысуы ең жоғарғы антидене титрін көрсетті. Алынған иммунды сарысу, токсоплазманың өзіне тән сезімталдығы жоғары антигенін алу жүргізілген жұмыстар үшін пайдаланылды.

Сонымен, қорыта келе, Үй қоянына жүргізілген иммунизация сұлбесі болашақта өндіріске керекті токсоплазма сарысуының проценті болатын жануарларға жүргізілетін иммундеу әдістеріне үлгі болды. Токсоплазма паразитімен үйқояндарын иммундеу арқылы алынған жоғары дәрежелі иммунды қансарысуы:

- токсоплазманың антигендік құрылымы анықтау және басқа туыстық паразиттермен антигендік байланысын зерттеуге пайдаланылды;

- токсоплазма, безноития және саркоспородия паразиттерінің антигендік компоненттерін алу үшін қажетті имунсорбенттерді жасауға пайдаланылды;

- токсоплазма, безноития және саркоспородия паразиттеріне қарсы иммундық ансарысуын алу үшін осы анықталған сұлбе пайдаланылды;

- токсоплазмоз ауруын серологиялық әдістермен анықтауда қажетті стандартты қансарысуын көпмөлшерде алу үшін пайдаланылатын үйжануарларын иммундеу үшін ұсынылған сұлбе пайдаланылды.

ӘДЕБИЕТ

[1] Грачева Л.И., Чумак Л.Г. Материалы к изучению антигенной структуры токсоплазм // Медицинская паразитология и паразитарные болезни. – М., 1970. – Т. 39, вып. 6. – С. 650-653.

[2] Казанцев А.П. Токсоплазмоз. – Мю, 1985. – С. 166.

- [3] Грачева Л.И., Савина М.А., Чумак Л.Г., Градковская Н.В. Лабораторная диагностика токсоплазмоза // Проблема токсоплазмоза. – Мю: Медицина, 1980. – С. 153-198.
- [4] Халилаев А.Н., Хван М.В. Токсоплазменные антигены и их использование для приготовления эритроцитарных диагностических препаратов // I науч.-теорет. и науч.-метод. конф. проф.-преп. состава МКТУ. – Туркестан, 1992. – С. 47-48.
- [5] Тимофеев Б.А. Неспецифические факторы резистентности при экспериментальном токсоплазмозе кроликов // Тр. ВИЭС. – М., 1970. – Т. 38. – С. 256-262.
- [6] Халилаев А.Н., Хван М.В., Рысулы М. Изучение антигенов токсоплазмиды эритроцитарными диагностикумами // Методические рекомендации. – Алматы, 1991. – С. 16.

REFERENCES

- [1] Gracheva L.I., Chumak L.G. Materials for the study of the antigenic structure of Toxoplasma. Medical Parasitology and Parasitic Diseases. Moscow, 1970. Vol. 39, N 6. P. 650-653.
- [2] Kazancev A.P. Toxoplasmosis. Moscow, 1985. 166 p.
- [3] Gracheva L.I., Savina M.A., Chumak L.G., Gradkovskaja N.V. Laboratory diagnosis of toxoplasmosis. The problem of toxoplasmosis. Moscow: Medicina, 1980. P. 153-198.
- [4] Halilaev A.N., Hvan M.V. Toxoplasma antigens and their use for the preparation of erythrocyte diagnostic products. I scien.-theor. and scien.-method. conf. IKTU. Turkestan, 1992. P. 47-48.
- [5] Timofeev B.A. Nonspecific resistance factors in experimental toxoplasmosis in rabbits. Tr. VIJeS. M., 1970. Vol. 38. P. 256-262.
- [6] Halilaev A.N., Hvan M.V., M. Rysuly. Study of erythrocyte antigens toksoplazmida diagnosticums. Guidelines. Almaty, 1991. 16 p.

МЕТОДЫ ПОЛУЧЕНИЯ ИЗ ДОМАШНИХ КРОЛИКОВ ИММУННОЙ КРОВЯНОЙ СЫВОРОТКИ ТОКСОПЛАЗМЫ

Р. А. Абылдаева, А. Д. Дауылбай, Г. С. Рысбаева

Южно-Казахстанский государственный университет им. М. Ауезова, Шымкент, Казахстан

Ключевые слова: инвазия, адьювантный, Т и В лимфоцитный, иммуноглобулин.

Аннотация. Результаты наших экспериментов показывают, что предварительное использование адьюванта повышает титр иммунной сыворотки токсоплазмы. Сильное действие адьюванта на синтез антигена при иммунизации дезинтегратором токсоплазмы и повышение адьювантом резистентности организма животных при иммунизации токсичной токсоплазмы были обнаружены. Точнее, при иммунизации токсичной токсоплазмы без использования адьюванта несколько домашних кроликов погибли, но при использовании адьюванта не показали отрицательные влияния.

Поступила 27.02.2015 г.