

Морфология

ID: 2012-11-7-A-1743

Оригинальная статья

Бриль Г.Е., Егорова А.В., Бугаева И.О., Штефанова Г.С.

Влияние УВЧ-излучения на процесс структурной самоорганизации бактериального липополисахарида

ГБОУ ВПО Саратовский ГМУ им. В.И. Разумовского Минздрава России

Резюме

Исследовано влияние низкоинтенсивного электромагнитного излучения на структурообразовательные свойства бактериального липополисахарида. Установлено, что низкоинтенсивное электромагнитное излучение частотой 1 ГГц, плотностью мощности 0,1 мкВт/см², воздействующее в течение 10 мин., приводит к изменениям в суспензионной системе ЛПС – физиологический раствор, которые отражаются на кинетике структурообразования.

Ключевые слова: бактериальный липополисахарид, низкоинтенсивное электромагнитное излучение

Введение

Бактериальный липополисахарид представляет собой амфифильный биополимер, сочетающий в пределах одной молекулы гидрофильные (О-специфические цепи, олигосахарид кора) и гидрофобный (липид А) фрагменты. Патогенные свойства ЛПС зависят не только от его химической структуры, но в значительной мере определяются характером пространственной организации надмолекулярных комплексов, образуемых молекулой ЛПС с различными компонентами биожидкостей [Варбанец Л.Д., 2004; Brandenburg K., 2004]

В настоящее время доказанным является модифицирующее влияние низкоинтенсивного лазерного излучения красной и фиолетовой областей спектра на процесс структурообразования бактериального ЛПС в водной суспензии и физиологическом растворе натрия хлорида [Агаджанова К.В., 2010]. Однако изменение способности ЛПС к самоорганизации путем образования макромолекулярных комплексов при воздействии НЭМИ изучено не было.

Цель: Изучить модифицирующее влияние низкоинтенсивного электромагнитного излучения с частотой 1 ГГц на структурообразовательные свойства бактериального липополисахарида.

Материал и методы

В работе использовался липополисахарид *E. coli* 055:B5 (фирма Sigma, США). ЛПС разводили *ex tempore* в 0,9% растворе натрия хлорида (20 мг/мл). Приготовленную суспензию делили на 2 пробы: одна являлась контролем другая в течение 10 мин. подвергалась электромагнитному воздействию с помощью аппарата «Акватон-2» (производитель фирма «Телемак», Саратов, Россия), генерирующего излучение с частотой 1 ГГц плотностью мощности 0,1 мкВт/см². Раструб излучателя помещался на расстоянии 10 см от облучаемого объекта.

Для изучения процесса спонтанного структурообразования ЛПС использовался метод клиновидной дегидратации [Шабалин В.Н., 2001], основанный на исследовании структурного следа (фации), формирующегося при высыхании капли препарата в стандартных условиях. 1 мкл исследуемой суспензии (контрольная проба) помещался на сухое, чистое, обезжиренное предметное стекло. Обычно наносились 6-8 капель для сравнительного анализа. Далее предметное стекло с препаратом в строго горизонтальном положении помещали в термостат и высушивали при 37°C в течение 30 мин. Аналогично с контрольными пробами готовились опытные препараты.

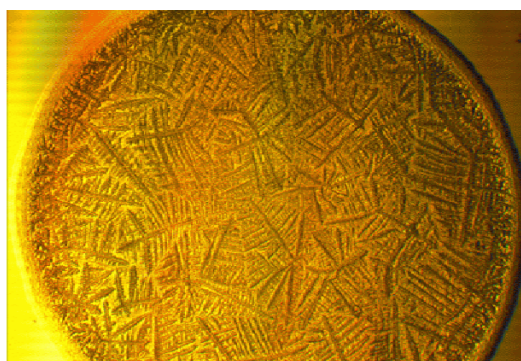
После высыхания препараты подвергались микроскопическому исследованию. Применялась световая микроскопия (Zeiss, Germany; увеличение 4, 10, 25, 40 раз) с фоторегистрацией структурного следа и сохранением информации в файле компьютера.

Имидж-анализ фаций включал их качественную характеристику, а также расчёт количественных показателей с последующей статистической обработкой.

При обработке фаций использовалась специальная компьютерная программа, позволяющая рассчитывать следующие параметры: S1 – площадь периферического ободка, нормированная на общую площадь фации; S2 – площадь промежуточной зоны, нормированная на общую площадь фации; S3 – площадь центральной зоны, нормированная на общую площадь фации; S1/S2 – смещение центра промежуточной зоны относительно центра ободка фации; S2/S3 – смещение центра центральной зоны относительно центра ободка фации. В центральной и промежуточной зонах фации рассчитывались: N – количество гребешков в типичном фрагменте фации; Average size (AS) – средний размер гребешков в типичном фрагменте фации; Entr. – неоднородность поверхности фации в типичном фрагменте; D corr. – корреляционная размерность типичного фрагмента. Количественные параметры обрабатывались статистически с использованием t-критерия Стьюдента с использованием статистического пакета программ Prism-4.

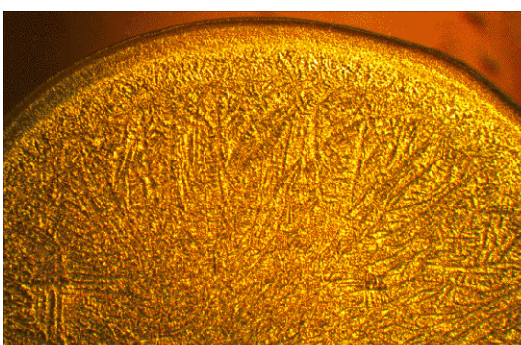
Результаты

Картина фаций, получаемых при дегидратации необлучённой суспензии ЛПС в физиологическом растворе (рис.1), отличалась разнообразием структурных элементов. Здесь чётко визуализировались 3 зоны: приподнятый ободок, обрамляющий фацию по периферии (периферическая зона), приободковая (или промежуточная) и центральная зоны.



Фасция необлученной суспензии ЛПС (рис.1)

Рис. 1. Фасция необлученной суспензии ЛПС



Фасция суспензии ЛПС облученного низкоинтенсивным электромагнитным излучением (рис.2)

Рис. 2. Фасция суспензии ЛПС, облученного низкоинтенсивным электромагнитным излучением

Ободок отличался малой структурированностью, лишь в отдельных его участках встречались мелкие глыбчатые образования. Приободковая зона занимала небольшую часть площади фасии и характеризовалась наличием мелких линейных дендритных и папоротникообразных элементов. В центральной зоне выявлялись крупные ветвистые образования, содержащий линейную основную ось с отходящими от неё под углом 90° боковыми ветвями.

Облучение суспензии ЛПС низкоинтенсивным электромагнитным излучением (рис.2) приводило к заметной модификации процесса структурообразования. При этом отмечались следующие типичные изменения в картине фасий: увеличивалась плотность пространственного распределения элементов в приободковой (промежуточной) зоне, утрачивалась их структурная чёткость. Линейные дендритные образования в центральной зоне значительно уменьшались в размерах, так что данная область фасии выглядела практически однородной. Но в непосредственной близости от приободковой зоны появлялись радиально ориентированные элементы с волнистой осевой направляющей ветвью и отходящими от неё под разными углами короткими ответвлениями.

Результаты количественной обработки фасий, получаемых при клиновидной дегидратации суспензии ЛПС в контроле и после УВЧ облучения, представлены в табл. 1.

Как видно из таблицы, воздействие низкоинтенсивным электромагнитным излучением с частотой 1 ГГц приводило к изменению относительных размеров различных зон фасии: уменьшались периферическая и приободковая зоны ($p < 0,01$ и $p < 0,001$ соответственно), в то время как размер центральной увеличивался на 20% ($p < 0,01$). После УВЧ – воздействия примерно в 2 раза возрастало количество гребешковых объектов в центральной и приободковой зонах фасии ($p < 0,05$). Однако их средний размер не претерпевал существенных изменений. На этом фоне в 1,2 раза увеличивался показатель Entr., характеризующий структурную неоднородность центральной зоны фасии ($p < 0,05$), а также на 32% возрастал показатель Entr. приободковой зоны ($p = 0,02$). Достоверно изменялась и структурированность (корреляционная размерность) обеих анализируемых зон ($p = 0,02$).

Обсуждение

Предположительно, влияние УВЧ на молекулу ЛПС опосредуется через изменение состояния водно-солевого окружения. В этих условиях изменяются гидратационные свойства водных молекул и, возможно, свойства гидрофобных и гидрофильных областей в молекуле ЛПС, что может отразиться на способности молекул токсина образовывать агрегаты.

Заключение

Результаты данных экспериментов свидетельствуют о том, что низкоинтенсивное электромагнитное излучение частотой 1 ГГц, плотностью мощности 0,1 мкВт/см², действующее в течение 10 мин., приводит к изменениям в суспензионной системе ЛПС – физиологический раствор, которые отражаются на кинетике структурообразования.

Таблица 1. Результаты статистической обработки количественных показателей имидж-анализа фаций, полученных при клиновидной дегидратации раствора ЛПС в контроле и после облучения УВЧ (1 ГГц)

Показатели	Контроль	УВЧ
S_1	n=8 0,411±0,01	n=8 0,353±0,01 p < 0,01
S_2	n=8 0,372±0,005	n=8 0,334±0,005 p < 0,001
S_3	n=8 0,222±0,013	n=8 0,278±0,007 p < 0,01
S_1/S_2	n=8 0,011±0,002	n=8 0,015±0,004 p > 0,05
S_2/S_3	n=8 0,019±0,003	n=8 0,023±0,005 p > 0,5
Центральная зона		
N об.	n=6 85,7±10,5	n=6 157,8±14,03 p < 0,05
Aver.	n=6 171,6±2,8	n=6 189,2±3,67 p > 0,5
Entr.	n=6 0,28±0,02	n=6 0,36±0,02 p < 0,05
D corr.	n=6 1,82±0,01	n=6 1,86±0,005 p < 0,02
Приободковая зона		
N об.	n=6 85,6±10,5	n=6 185,2±14,7 p < 0,05
Aver.	n=6 156,2±24,2	n=6 206,8±23,9 p > 0,1
Entr.	n=6 0,301±0,02	n=6 0,4436±0,003 p < 0,02
D corr.	n=6 1,826±0,013	n=6 1,869±0,002 p < 0,02

p – достоверность различий с контролем

Литература

1. Агаджанова К.В. Влияние низкоинтенсивного лазерного излучения на структурообразовательные свойства и биологические эффекты бактериального липополисахарида. Дис....канд. мед. наук, Саратов, 2010.
2. Варбанец Л.Д. Структура, функция, биологическая активность эндотоксинов грамотрицательных бактерий (обзор) / Л.Д. Варбанец, Н.В. Винарская // Современные проблемы токсикологии. Киев: ООО «Медицина Украины», 2004. № 1. С. 9-13.
3. Шабалин В.Н. Морфология биологических жидкостей человека / В.Н. Шабалин, С.Н. Шатохина // М.: Хризостом, 2001. 304 с.
4. Brandenburg, K. Endotoxins: relationships between structure, function, and activity / K. Brandenburg, A. Wiese // Curr. Top. Med. Chem. 2004. Vol. 4. P. 1127-1146.