

М. М. АГАБАБЯН

## ИЗУЧЕНИЕ РАСПРОСТРАНЕНИЯ СИБИРЕЯЗВЕННЫХ ВАКЦИН В ОРГАНИЗМЕ ПУТЕМ ПРИМЕНЕНИЯ РАДИОАКТИВНЫХ ИНДИКАТОРОВ

Активная иммунизация против сибирской язвы живыми ослабленными споровыми культурами *V. anthracis*, предложенная в 1883 г. проф. Л. С. Ценковским и применяемая до сих пор, дала блестящие результаты.

Несмотря на достигнутые успехи в этой области, недостаточно разработаны некоторые вопросы иммуногенеза сибирской язвы. Такие вопросы, как сроки нахождения в организме противосибиреязвенных вакцин, судьба этих вакцин в организме, слабо освещены в литературе. Однако стало известно, что сроки нахождения вакцин Ценковского под кожей равнялись 6—8 дням.

Учитывая недостаточную разработку вопроса о судьбе 1-й и 2-й вакцин Ценковского в организме животного, мы использовали метод метки микробов радиоактивными веществами и изучили: а) динамику распространения и накопления меченых (радиосерой) вакцин Ценковского в нормальном организме и б) динамику распространения меченых бактерий сибирской язвы в иммунизированном организме.

Для решения указанных вопросов необходимо было сначала получить меченые бактерии 1-й и 2-й вакцин Ценковского. В качестве радиоактивного вещества использовали радиосеру в виде метионина.

Для получения микробов с наибольшей радиоактивностью нам пришлось изыскать специальную питательную среду, которая не содержала в себе серы или содержала в минимальном количестве, т. к. при выращивании бактерий на обыкновенных питательных средах, содержащих радиоактивную серу, поглощение последней микробами из питательной среды оказывалось весьма незначительным. Такой средой в наших опытах оказался глицерино-пептонный агар\*. Глицерино-пептонный агар, содержащий радиоактивную серу в концентрации 5,5 микрокюри на 1 мл питательной среды, разливался в пробирки и, после скашивания, на ней производился засев 1-й и 2-й вакцин Ценковского в отдельности (вакцины Калужской биофабрики, изготовление от 4/1 и 19/III — 1956 г.). Засеянные пробирки помещались в термостат для выращивания и спорообразования при температуре 34—35° на 6 суток. После такого срока выдерживания пробирок с посевами в термостате производилась про-

\* Сообщение первое. «Известия АН АрмССР» (биол. науки), т. XII, № 1, 1959.

верка вакцин на чистоту, типичность роста и спорообразование. При обнаружении посторонних микробов и нехарактерного роста, такие пробы браковались, а пробы с вакциной, оказавшиеся чистой и с наличием полноценных спор, смывались физиологическим раствором.

После смыва вакцины промывались путем четырехкратного центрифугирования для освобождения адсорбированного на микробных телах радиосеры. Из отмытых вакцин готовилась микробная взвесь, содержащая по стандарту мутности 5 млрд микробных тел в 1 мл, и определялась радиоактивность этой взвеси в 0,1 мл при помощи торцового счетчика.

При постановке опытов по изучению меченых бацилл в организме животных, мы имели в виду выявление сроков нахождения вакцины и места локализации.

Опыты ставились на кроликах весом от 1500 г до 1800 г. Всего было проведено две серии опытов.

В первой серии опытов 6 кроликам вводилось под кожу меченой 1-й вакцины Ценковского в количестве 1 мл, с радиоактивностью 1,7 микрокури. Через 8 дней инъецировалась 2-я вакцина в дозе 1,5 мл с общей активностью 1,95 микрокури. В качестве контроля взяты были 3 кролика, которые не подвергались вакцинации, а вводилась под кожу, только радиосера радиоактивностью в 2,15 микрокури. От подопытных кроликов через 1, 2, 3, 5 суток, а в дальнейшем через каждые 5 дней, из краевой вены уха бралась проба крови и измерялась радиоактивность.

На кривой приводятся сводные данные средних показателей радиоактивности крови у всех подопытных кроликов.

Время в днях

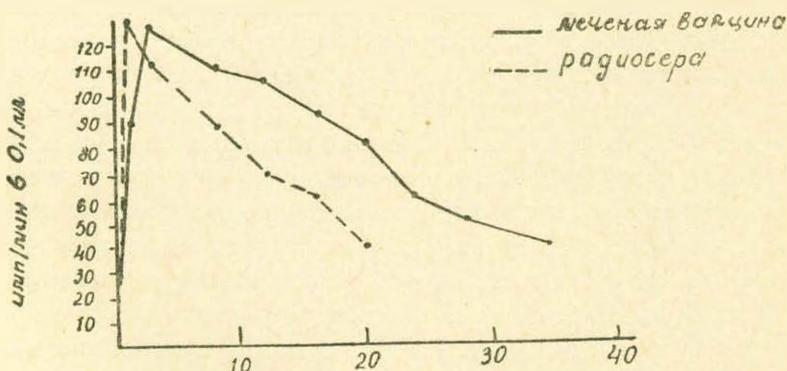


Рис. 1. Изменение концентрации радиосеры в крови после введения меченых вакцин Ценковского и одной радиосеры.

Как видно из рис. 1, после введения меченых вакцин Ценковского в течение двух суток увеличивается радиоактивность крови, которая потом уменьшается. Уменьшение концентрации радиосеры в крови идет

медленно и доходит до минимума, почти фона\*, в течение 35 дней. У контрольных кроликов, которым была введена только радиосера, характер кривой отличается от кривой кроликов, получивших меченую вакцину. При этом, после резкого увеличения радиоактивности крови происходит быстрое снижение концентрации радиосеры и достигает минимума на 20-е сутки.

Таким образом, результаты опыта показывают, что при подкожном введении кроликам меченых вакцин Ценковского радиоактивность крови в наибольшем количестве обнаруживается в первые два дня; в последующие дни медленно падает и доходит до минимума на 35-й день, тогда как у контрольных кроликов радиоактивность крови снижается быстрее и минимальное количество индикатора обнаруживается через 20 дней после введения радиосеры.

Далее изучалось распространение меченых вакцин по органам. Этот опыт разбивался на две части: в первой части изучалось распространение меченых вакцин в органах кроликов через 20 дней после вакцинации, а во второй части — распространение вакцин, содержащих радиосеру по отдельным органам животных в конце опыта (через 35 дней).

Из шести иммунизированных кроликов, через 20 суток после введения меченых вакцин, два кролика совместно с тремя контрольными, у которых активность крови доходила до минимума в этот же срок, были забиты для определения радиоактивности органов. Концентрация радиосеры высчитывалась на 100 мг веса органа.

Полученные результаты представлены на рис. 2 и 3.

Сравнивая радиоактивность органов кроликов, иммунизированных меченой вакциной, и контрольных, получивших радиосеру, была отмечена высокая радиоактивность органов у первых. Активность 100 мг печени или селезенки кроликов, получивших меченую вакцину, выражалась 210—230 имп. мин., у контрольных радиоактивность этих же органов составляла 48—55 имп. мин., то есть в четыре раза меньше.

Кроме того, как видно из рис. 2, распределение меченого антигена по органам происходит неравномерно. У кроликов, получивших меченые вакцины, концентрация радиоактивной вакцины больше всего обнаруживается в печени, затем в селезенке и в почках, в меньшем количестве — в головном мозгу, в мышцах и в костном мозгу. Это свидетельствует о том, что различные отделы ретикуло-эндотелиальной системы неравноценны в своей способности поглощать микробы, белковые или ииородные вещества, и что наибольшее поглощение в нашем опыте имело место со стороны клеток печени и селезенки. Что касается распространения радиосеры по отдельным органам у контрольных кроли-

\* Фон — количество импульсов, обнаруживаемое на счетчике под влиянием космических лучей.

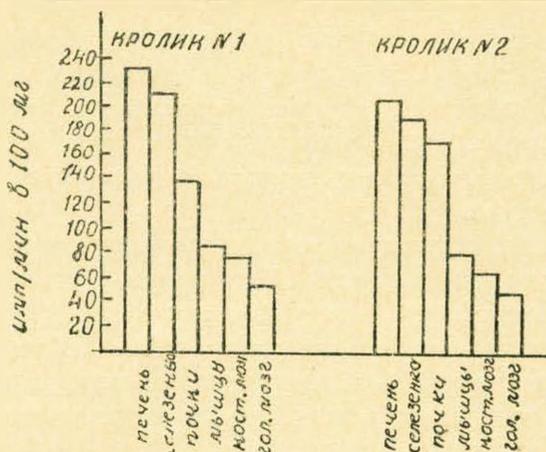


Рис. 2. Распространение меченой вакцины по органам кроликов через 20 дней после иммунизации.

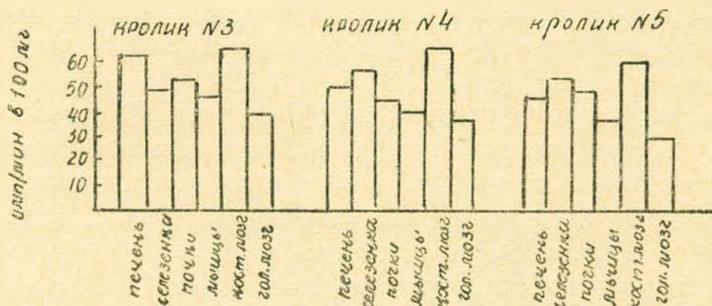


Рис. 3. Распространение радиосеры по органам кроликов через 20 дней после введения индикатора.

ков, то на 20-й день после введения радиоактивного вещества обнаруживалась низкая активность всех исследованных органов. Распределение радиосеры в печени, селезенке и в почках у всех 3 кроликов было почти одинаковое. Концентрация индикатора в мышцах и в головном мозгу была на низком уровне, тогда как в костном мозгу — больше, чем в остальных органах, что, очевидно, объясняется принадлежностью этого органа ретикуло-эндотелиальной системе.

Для решения второй части опыта, т. е. срока сохраняемости и распространения меченых вакцин по отдельным органам животных в конце эксперимента, на 35-й день после введения меченой вакцины оставшиеся 4 кролика были забиты и органы их подвергнуты исследованию.

Данные опыта представлены на рис. 4.

Измерение проб показало, что во всех исследованных органах обнаруживается низкая радиоактивность, и что концентрация ее в печени, селезенке, почках и костном мозгу почти одинаковая, а в мышцах она обнаруживается в наибольшем количестве по сравнению с другими тканями.

Так, если средняя суммарная радиоактивность печени, селезенки, почек и костного мозга равна 66 имп./мин., то в мышцах она равна 88 имп./мин., т. е. уровень накопления меченой вакцины в мышцах остается таким же, каким был у кроликов, забитых через 20 дней после иммунизации. Одинаковое содержание меченой вакцины в мышцах у кроликов, забитых через 20 и 35 дней, по-видимому, можно объяснить тем, что обмен веществ в мышечной ткани животных происходит гораздо медленнее, чем в клетках РЭС.

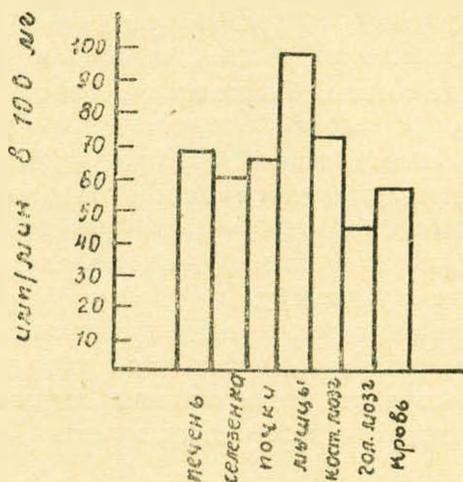


Рис. 4. Распространение меченой вакцины по органам кроликов в конце опыта.

Таким образом, проведенные исследования показали: во-первых, что на 20-й день после иммунизации введенные в организм кроликов меченые вакцины обнаруживаются в наибольшем количестве в печени, селезенке и почках, в меньшем — в головном, в костном мозге и в мышцах; во-вторых, накопление радиосеры, у контрольных, невакцинированных кроликов, в этот же срок, при таких же условиях, было значительно ниже, меньше чем в 4 раза; в-третьих, наименьшее количество меченой вакцины в органах иммунизированных кроликов обнаруживалось через 35 дней после введения 1- и 2-й вакцины Ценковского.

Применяя метод меченых атомов, естественно, большой интерес должен представлять процесс перехода микробных тел, токсина или иммуногенного вещества в кровь или органы. Чем же обуславливается обнаруживаемая в крови и в органах радиоактивность? Прохождением микробных тел или продуктов их распада, содержащих радиосеру, или просто радиоактивные вещества. Вряд ли можно полагать нахождение *B. anthracis* 1- и 2-й вакцины Ценковского в печени, селезенке или почках в виде корпускулярных тел в течение 20 и более дней, так как по известным литературным данным через 6—8 суток после введения вакцины происходит лизис и распад бацилл.

В. Л. Троицкий с сотрудниками, применяя метод метки бактерии радиоактивными изотопами при изучении иммунитета дизентерии, от-

мечает, что при иммунизации лабораторных животных радиоактивность в органах обуславливается прохождением полных антигенов или иммуногенов, содержащих радиоактивное вещество.

Известно, что полный антиген это есть полисахаридно-липоидно-белковый комплекс, который получается при экстракции бактерии 0,25 нормальным раствором трихлоруксусной кислоты на холоду. Однако Л. А. Зильбер указывает, что при получении полных антигенов из бактериальной массы извлекается не весь содержащийся в ней полный антиген. И что, согласно исследованиям Кошкина, Фрадкиной, Холчева и др., остающийся после извлечения полных антигенов субстрат обладает иммунизирующим действием. Следовательно, после введения в организм кроликов 1- и 2-й вакцины Ценковского, хотя микробы подвергаются расщеплению, лизису, однако этот продукт расщепления микробных тел нельзя считать свободным от полного антигена или иммуногена.

Значит, обнаруживаемая в крови и в органах радиоактивность обуславливается наличием в органах иммунизирующего вещества — полного антигена, содержащего радиосеру.

Как показали наши опыты, у вакцинированных кроликов радиоактивность крови и органов сохраняется на 15 дней дольше, чем у контрольных, следовательно, это также свидетельствует о наличии в крови и органах иммунизированных животных меченого антигена (иммуногена).

Во второй серии опытов важно было изучить динамику распространения меченых сибирезвешенных бацилл в иммунизированном организме.

Для решения этой задачи 6 кроликам вводилась под кожу 1-я вакцина Ценковского по 0,5 мл и через 8 дней — 2-я вакцина в той же дозе. Через 30 суток после вакцинации эти животные заражались меченой сибирезвешенной вирулентной культурой (штамм № 575). Штамм *V. anthracis* был получен из Республиканской ветбаклаборатории; перед заражением эта культура была протитрована на кроликах и установлена минимальная смертельная доза. Культура, в виде микробной взвеси, вводилась под кожу по 1 мл 1 млрд. концентрации с радиоактивностью 1,6 микрокюри.

Одновременно в качестве контроля 3 неиммунизированным кроликам вводилась только радиосера той же активности (1,6 микрокюри).

На рис. 5 приводятся сводные данные средних показателей радиоактивности крови всех подопытных кроликов.

После заражения меченой культурой и введением радиосеры ежедневно из краевых ушных вен кроликов брались пробы крови и определялась радиоактивность. Исследование показало, что у иммунизированных кроликов, зараженных через 30 суток после вакцинации, радиоактивность крови снижается сравнительно быстро и на 8-й день доходит до минимума, т. е. до фона.

У контрольных кроликов уменьшение концентрации индикатора в крови проходило в более длительный срок — на 16-е сутки.

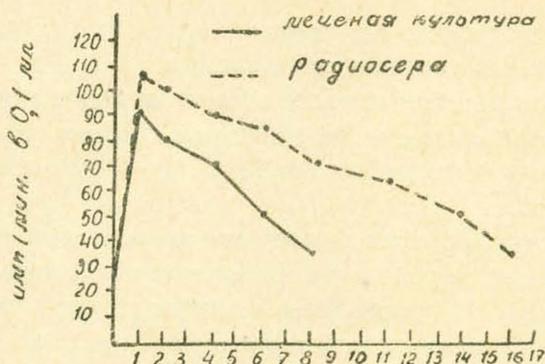


Рис. 5. Изменение концентрации радиосеры в крови кроликов после заражения меченой сибирязвенной культурой.

После получения таких результатов по исследованию крови, подопытные кролики были забиты, а органы их подвергнуты исследованию на присутствие в них индикатора.

Результаты опыта представлены на рис. 6 и 7.

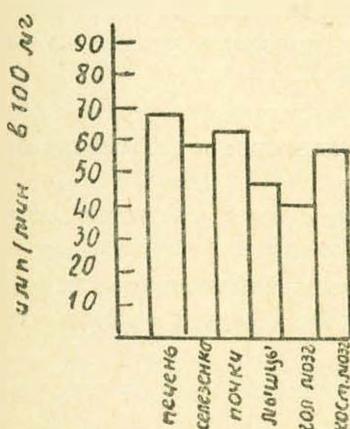


Рис. 6. Распространение меченой сибирязвенной бактерии по органам иммунизированных кроликов.

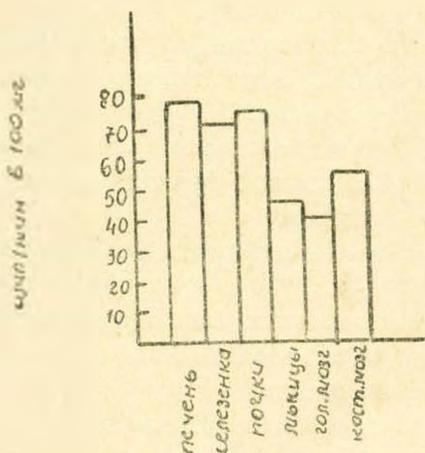


Рис. 7. Распространение радиосеры по органам кроликов.

Измерение радиоактивности органов иммунизированных и забитых на 8-й день после заражения кроликов показало их значительно меньшую радиоактивность и неравномерное распределение меченого сибирязвенного микроба по органам.

При исследовании органов контрольных, неиммунизированных, и забитых на 16-й день после введения радиосеры кроликов было обнаружено, что концентрация радиоактивного вещества несколько больше и характер распределения его такой же, как в органах иммунизированных кроликов.

Таким образом, исследование забитых животных показало, что по-

лученные данные сходятся с показателями радиоактивности крови у иммунизированных и контрольных кроликов.

На основании описанных выше опытов можно констатировать, что иммунизированный организм освобождается от введенного вирулентного сибиреязвенного микроба значительно быстрее, чем неиммунизированный организм.

Таким образом, динамика изменения радиоактивности крови и органов у иммунизированных против сибирской язвы животных показывает, что возбудитель сибирской язвы в иммунном организме не остается длительное время, что свидетельствует о факте усиления фагоцитарной активности ретикуло-эндотелиальной системы иммунизированных животных.

Основоположник фагоцитарной теории И. И. Мечников в своих лекциях, прочитанных в 1891 г. в Пастеровском институте, сообщает, что он и его сотрудники при сибирской язве наблюдали лейкоцитоз, а также поглощение лейкоцитами возбудителя сибирской язвы.

Придавая большое значение лейкоцитозу в сибиреязвенном процессе, С. Н. Вышелесский считает, что увеличение лейкоцитов тормозит развитие септицемии.

А. Б. Бояхчян, изучая фагоцитарную деятельность лейкоцитов у иммунизированных против сибирской язвы животных, установил выраженный лейкоцитоз в иммунном организме.

Результаты нашего опыта также подтверждают эти данные об активной защитной функции иммунного организма против сибиреязвенного микроба.

На основании этих исследований мы не считаем окончательно решенным вопрос о том, обусловлена ли обнаруживаемая в крови и органах радиоактивность присутствием в них меченой вакцины или радиосеры, которая могла освободиться из микробных клеток в результате их гибели и лизиса.

Задачей дальнейших исследований должно быть извлечение из сибиреязвенных бацилл полисахаридно-липоидно-белкового комплекса, который обладает значительной устойчивостью к ферментативному расщеплению, и, вероятно, этот меченый комплекс достаточно длительное время останется в организме неразрушенным, что даст возможность изучить некоторые вопросы патогенеза сибирской язвы.

### В ы в о д ы

1. При выращивании 1- и 2-й вакцины Ценковского на глицерино-пептонном агаре, содержащем радиоактивную серу в виде метионина, удалось получить меченые бациллы сибирской язвы 1- и 2-й вакцины. Меченые вакцины нами были использованы для изучения распространения их в организме животных.

2. При подкожном введении кроликам меченых вакцин Ценковского радиоактивность крови в наибольшем количестве обнаруживалась в

первые 2 дня, а в последующие дни медленно снижалась и доходила до фона на 35-й день, между тем как у контрольных кроликов, которым вводилась только радиосера, активность крови падала раньше и минимальное количество индикатора в крови обнаруживалось через 20 дней после введения радиоактивного вещества.

При определении активности органов животных, через 20 суток после введения меченых вакцин обнаруживалась высокая радиоактивность печени, селезенки и почек, тогда как у контрольных кроликов радиоактивность этих же органов уменьшалась в 4 раза.

4. В конце опыта, т. е. на 35-й день после введения меченой вакцины, во всех исследованных органах обнаруживалась низкая радиоактивность. Распределение радиоактивности по органам было почти одинаковое.

5. У иммунизированных животных, при подкожном введении меченых вирулентных бацилл сибирской язвы, обнаруживаемая в крови радиоактивность быстро снижалась и на 8-й день доходила до минимума, между тем как у контрольных кроликов индикатор в крови оставался более длительное время, т. е. в 2 раза дольше.

6. На 8-й день, после введения меченой вирулентной сибиреязвенной культуры, у иммунизированных кроликов обнаруживалось значительное снижение радиоактивности органов, причем это распределение радиоактивности по органам было неравномерное. При исследовании органов контрольных и забитых на 16-й день после введения индикатора кроликов концентрация радиосеры оказалась несколько больше, чем у иммунизированных. На основании полученных данных можно констатировать, что иммунизированный организм освобождается от введенного радиоактивного сибиреязвенного микроба значительно быстрее, чем неиммунизированный организм от радиосеры.

Кафедра эпизоотологии  
Ереванского зооветеринарного института

Поступило 6.II 1958 г.

Մ. Մ. ԱՂԱՐԱՅԱՆ

ՌԱԵՐՈԱԿՏԻՎ ԻՆԴԻԿԱՏՈՐԻ ԿԻՐԱՌՄԱՆ ՄԻՋՈՑՈՎ ՕՐԳԱՆԻԶՄՈՒՄ  
ՍԻԲԵՐԱՆՏԻ ՎԱԿՅԻՆԱՆԵՐԻ ՏԱՐԱԾՄԱՆ ՈՒՍՈՒՄԱԿԱՍԻՐՈՒԹՅՈՒՆԸ

Ա Վ Փ Ո Փ Ո Ւ Մ

Արբիբախտի իմունիտետի վերաբերյալ կան մի շարք արժեքավոր աշխատություններ, սակայն այդ հիվանդության իմունոգենների որոշ հարցեր դրականության մեջ թույլ են լուսաբանված:

Նկատի ունենալով այն, որ Յենկովսկու 1-ին և 2-րդ վակցինաների վիճակը կենդանու օրգանիզմում անբավարար է մշակված, ուստի մենք որոշեցինք օգտագործել միկրոբներ նշելու մեթոդը ռադիոակտիվ ինդիկատորների միջոցով և ուսումնասիրել արբիբախտի դեմ մեր պատրաստած ռադիոակտիվ վակցինա-

ների տարածման ու կուտակման դինամիկան նորմալ և իմունացված օրգանիզմներում:

Մեր կատարած հետազոտությունների արդյունքները թույլ են տալիս անելու հետեւյալ եզրակացությունները.

1. Ռադիոակտիվ ծծումբ (որպես մետրոնին) պարունակող դիցերին-պեպտոնային ազարի վրա Ցենկովսկու վակցինաներն աճեցնելիս հաջողվեց ստանալ սիրիբախտի նշված (ռադիոակտիվ) 1-ին և 2-րդ վակցինաների կուտուրան: Ստացված ռադիոակտիվ վակցինաները օգտագործվել են նրանց տարածումը կենդանիների օրգանիզմում ուսումնասիրելու համար:

2. Ցենկովսկու նշված վակցինաները ճագարներին ներարկելուց հետո, արջան ռադիոակտիվությամբ մեծ չափով դրսևորվում է առաջին երկու օրը, իսկ հաջորդ օրերին ակտիվությունը դանդաղ նվազում է և 35-րդ օրը հասնում մինչև ֆոնը<sup>1</sup>, մինչդեռ կոնտրոլ ճագարների մոտ, որոնց ներարկվում է միայն ռադիոակտիվ ծծումբ, արջան ակտիվությունն իջնում է ավելի արագ և ինդիկատորի ամենափոքր քանակը արջան մեջ հայտնաբերվում է ռադիոակտիվ նյութի ներարկումից 20 օր հետո:

2. Նշված վակցինաների ներարկումից 20 օր հետո կենդանիների օրգանների ռադիոակտիվությունը սրողելու ժամանակ հայտնաբերվել է լյարդի, փայծաղի և երիկամների բարձր ակտիվություն, մինչդեռ կոնտրոլ ճագարների մոտ նույն օրգանների ռադիոակտիվությունը նվազել է 4 անգամ:

4. Փորձի վերջում, այսինքն նշված վակցինաների ներարկումից 35 օր հետո, բոլոր հետազոտված օրգաններում հայտնաբերվել է ցածր ռադիոակտիվություն: Ռադիոակտիվության տարաբաշխումը օրգաններում միատեսակ էր:

5. Ցենկովսկու սովորական վակցինաներով իմունացման ենթարկված ճագարներին ռադիոակտիվ սիրիբախտի բացիլներով վարակելու դեպքում արջան մեջ հայտնաբերված ռադիոակտիվությունը արագ իջնում է և 8-րդ օրը հասնում մինիմումի (ֆոնի), այնինչ կոնտրոլ ճագարների մոտ ինդիկատորն արջան մեջ մնում է ավելի երկար՝ 16 օր:

6. Իմունացված ճագարների մոտ, ռադիոակտիվ վիրուսենտ սիրիբախտի կուլտուրայի ներարկման 8-րդ օրը հայտնաբերվել է օրգանների ռադիոակտիվության զգալի նվազում, ընդ որում ռադիոակտիվ կուլտուրայի տարաբաշխումը օրգաններում եղել է անհավասարաչափ: Կոնտրոլ ճագարների օրգանների հետազոտման ժամանակ ռադիոծծմբի կոնցենտրացիան անհամեմատ ավելի էր, քան իմունացված կենդանիներին մոտ, իսկ նրա տարաբաշխման բնույթը նույնն էր, ինչ և վակցինացման ենթարկված կենդանիների օրգաններում:

<sup>1</sup> Փոն — իմունության քանակը, որը հայտնաբերվում է հաշվիչի կողմից կոմիկակական ճառագայթների ազդեցության տակ: