

Изучение действия ПАЙЛЕР-света на защитные силы организма при летальной вирусной инфекции в эксперименте

В.А.Дивоча

Одесский государственный медицинский университет, Одесса, Украина

Введение

Использована модель лабораторных животных (белые мыши) с применением смертельной дозы вируса гриппа AP/R/8/3 (H1N1) и последующего их лечения ПАЙЛЕР-светом.

Установлено, что лечение поляризованным, полихроматическим, некогерентным светом (ПАЙЛЕР-светом) животных зараженных летальной дозой вируса гриппа задерживало активность размножения вируса и животные не погибали, а оставались живы и на 15-й день после заражения. Инфекционная и гемагглютинирующая активность определялась в незначительных количествах, т.е. под действием ПАЙЛЕР-света вирус гриппа А не погибал, а тормозилось его размножение. За этот период происходило восстановление ингибиторной (защитной) активности и животные выживали.

Организм человека и животных зависит от различных жизненных источников энергии: света, воздуха, воды, продуктов питания и положительных электромагнитных волн поступающих из окружающей среды. Недостаточное поступление в организм жизненно важных источников энергии ведет к снижению защитных сил организма результатом которого являются различные заболевания. Наиболее распространенным и contagiозным заболеваниям является грипп. В настоящее время, несмотря на широкие научные программы по гриппу, принятых во многих странах мира, успехи в лечении гриппа довольно ограничены. Арсенал средств специфической терапии гриппа ограничен ремантадином и его аналогами. В настоящем сообщении формируется новый подход к лечению гриппа, который обосновывается на экспериментальных данных в опытах на животных.

Целью данных исследований являлось изучение эффективности действия поляризованного, полихроматического света на защитные силы организма белых мышей, предварительно зараженных смертельной дозой вируса гриппа.

Материалы и методы

В работу взято 330 шт. белых мышей, линии "Balba" весом 13-14 гр., 160 шт куриных эмбрионов /10-11 суточных/, вирус гриппа AP/R/8/34 /H1N1/ полученный из музея вирусных штаммов НИИ вирусологии им. Д.И.Ивановского АМН России. Вирус гриппа адаптированный к белым

мышам и прошедший 4 пассажа его инфекционный титр составлял 10^{-1} LD_{50/0,1} мл. В работе использовали три дозы вируса : цельный вирус гриппа и его разведения 10^{-1} и 10^{-2} . Доза 10^{-1} LD_{50/0,1} мл была смертельной для белых мышей (когда погибают 100 % животных). Доза 10^{-2} LD_{50/0,1} мл — терапевтической (когда погибают 50 % животных). Прибор "Биоптрон" фирмы "Цептер Интернациональ Украина", обладающий поляризованным, некогерентным, полихроматическим светом с длиной волны 400-2000 нм, с ежеминутной энергией света 2.4 Дж/см.

Животные были разбиты на семь групп по 10 штук в каждой. Первая, вторая, третья, четвертая, пятая и седьмая группы контрольные : первая и седьмая группы - контрольные для действия вируса гриппа А; третья группа - контрольная для действия поляризованного, некогерентного света лампы "Биоптрон"; четвертая группа - контрольная для действия физиологического раствора, используемого для разведения вируса гриппа; пятая группа - для контроля состояния здоровья животных взятых для исследований. Первая и вторая группы заражены смертельной дозой вируса гриппа /1LD_{50/0,1} мл/ Вторая группа, после заражения получила одиннадцать сеансов ПАЙЛЕР - света (поляризованный, некогерентный, полихроматический свет). Шестая группа животных, перед заражением, получила восемнадцать сеансов светоблучения, после чего была заражена вирусом гриппа в дозе 0.5LD_{50/0,1} мл (терапевтическая доза - когда погибает 50 % животных). После заражения эта группа животных прошла курс светолечения (восемнадцать сеансов на мышь).

Заражение животных проводилось интраназально под легким эфирным наркозом. Светоблучение проводилось со стороны спины сразу после заражения и через шесть часов после заражения в первые сутки. В дальнейшем облучение проводилось по два раза сутки на протяжении 8 суток, по 6 минут на сеанс.

На пятнадцатые сутки после заражения все животные которые остались живы были вскрыты под глубоким эфирным наркозом. У них забраны легкие и кровь. У погибших животных забраны только легкие. Легкие трижды отмыты в 0.01 М фосфатном буфере, разрезаны ножницами, растерты со стеклом в фарфоровой ступке и обработаны ультразвуком при 18 Гц по 75 секунд на приборе Soniprep 150 MSE. Вся работа проводилась на холоду. Гомогенат легких растворен в 0.01 М фосфатном буфере с pH 7.5 1:1 /1 легкое на 1 мл. В дальнейшем гомогенат центрифугировали при 7.000 об/мин 15 минут. Супернатант легких и сыворотку белых мышей использовали для определения протеазной и ингибирующей активности вируса, геммагглютина вируса гриппа, белка и инфекционной активности вируса.

Инфекционный титр вируса гриппа в легких и в сыворотке крови инфицированных мышей определяли путем заражения 10-11 дневных куриных эм-

брионов и выражали в ЭИД_{50/0,2} мл (эмбриональная инфекционная доза при которой 50% куриных эмбрионов погибают при введении вируса гриппа).

Для данной работы использовали 160 штук куриных эмбрионов (10-11 суток), легкие и сыворотку крови инфицированных белых мышей ,40 штук/ и вирус гриппа AP/R/8\34 / H1N1/.

Инфицированные легкие и сыворотки крови были объединены в пулы по группам животных и по суткам заражения. Для определения инфекционного титра вируса гриппа брали легкие погибших белых мышей первой группы на 4, 5 и 6 сутки после заражения. У второй группы животных брали легкие на 5, 6, 7 и 14 сутки после заражения; кровь только у животных на 14 сутки после заражения. В шестой и седьмой группах использовали легкие и кровь белых мышей оставшихся живыми на 15 сутки после заражения. Из каждого пула легких или сыворотки крови начиная с 10^{-1} до 10^{-8} на каждое разведение использовали по два куриных эмбриона. В стерильных условиях, в аллантоисную полость куриных эмбрионов вводили изучаемый материал в объеме 0.2 мл. Отверстие в куриных эмбрионах запечатывали парафином и ставили в термостат при температуре +37С на 48 часов для инкубации вируса. Через 48 часов эмбрионы переносили в холодильник при температуре +4С на 487 часов для охлаждения. При этом кровеносные сосуды сужаются и мы получаем чистую, свободную от крови, аллантоисную жидкость , в которой определяем гемагглютинирующую активность для выяснения инфекционного титра. Реакцию гемагглютинации ставили по общепринятой методике с 1% куриными эритроцитами /1/. Протеазную активность определяли по гидролизу протамина методом К.М.Веремеенко /2/ в модификации С.В.Вовчука /3/.Определение ингибиторов протеаз в гомогенатах легких и сыворотке крови и аллантоисной жидкости проводили казеиновым методом предложенным А.П.Левецким /4/. Реакцию гемагглютинации проводили по общепринятой методике с 1% раствором куриных эритроцитов. Определение белка проводили по методу W.Lowry /5/.

Результаты исследований и их обсуждение

Как показали исследования 100% гибель животных первой группы, предварительно зараженных смертельной дозой вируса гриппа А /H1N1/, наступала на шестые сутки. Во второй группе, которая проходила курс светолечения после предварительного заражения смертельной дозой вируса гриппа, погибло 80% животных. Смертность приостановилась на седьмые сутки после заражения.

В третьей группе, которая была контролем для поляризованного некогерентного света лампы "Биоптрон" все животные остались живы после получения 18 сеансов света.

Животные четвертой и пятой групп оставались живы на весь период исследований (15 суток).

В седьмой группе - контрольной для терапевтической дозы, вируса гриппа, 50% животных погибли на седьмые сутки после заражения.

В шестой группе - получившей терапевтическую дозу вируса гриппа и 18 сеансов поляризованного полихроматического света после заражения, 20% животных погибло через 48 часов после заражения. 80% животных выжили и остались живы на 15 сутки после заражения.

Таким образом, 20% животных зараженных смертельной дозой вируса гриппа и прошедшие курс светолечения, оставались живы тогда как контрольные животные не проходившие курс лечения погибали на 6 сутки после заражения. 80% животных, предварительно зараженных терапевтической дозой вируса гриппа и прошедшие курс светолечения оставались живы.

На 15 сутки после заражения, под глубоким наркозом животных вскрыли и взяли легкие и кровь для изучения изменений в органах под действием вируса и поляризованного, некогерентного полихроматического света. У погибших мышей забраны легкие.

При определении общего белка в легких животных первой группы отмечалось повышение его на четвертые сутки по сравнению с контрольной пятой группой. На седьмые сутки количество белка резко падало и животные погибали. Во второй группе начиная с шестых суток после заражения, происходило постепенное уменьшение белка. У животных оставшихся в живых количество белка на 14 сутки после заражения как в легких так и в сыворотке крови, восстанавливалось до нормы. В 3,4 и 5 группах количество белка как в легких так и в сыворотке крови мало чем отличалось от контрольной пятой группы. В седьмой группе количество белка в легких увеличено, в то время как в сыворотке крови отмечалось незначительное падение белка.

Таким образом, под действием смертельной дозы вируса - гриппа ($1LD_{50/0.1}$ мл) в организме белых мышей изначально происходит повышение белка, а к гибели животных общий белок снижался. Под действием терапевтической дозы вируса гриппа $/0,5 LD_{50/0.1}$ мл/ количество белка в легких увеличивалось в два раза на 15 сутки после заражения, а в сыворотке крови - не значительно падало.

Протеазная активность в первой и второй группах повышалась на пятые сутки после заражения. В дальнейшем она падала. В третьей группе отмечается падение протеазной активности только в сыворотке крови.

В четвертой группе падение протеазной активности отмечалось как в легких, а и в сыворотке крови полностью отсутствовала. В шестой группе отмечался подъем протеазы в легких, а в сыворотке крови - падение. В седьмой группе, на 14 сутки после заражения терапевтической дозой, отклонений в протеазной активности не наблюдалось.

Таким образом, под действием вируса гриппа, физиологического раствора и поляризованного некогерентного света происходит падение протеазной активности.

У здоровых животных ингибиторная активность в легких составляла 1.16 мг/мл, в сыворотке крови -168.7 мг/мл. В первой группе повышение ингибиторной активности отмечено через 5 суток после заражения. Во второй группе значительно повышалась ингибиторная активность в легких белых мышей на 6 сутки после заражения. У выживших мышей на 14 сутки после заражения в крови отмечался резкий подъем ингибиторной активности до 120,95 мг/мл.

В третьей группе под действием поляризованного некогерентного света происходило полное подавление ингибиторной активности в легких и на 50% в сыворотке крови /80,123 мг/мл/. В четвертой группе под действием физиологического раствора наблюдалось повышение ингибиторной активности в легких до 11 мг/мл. В седьмой группе, контрольной для действия терапевтической дозы вируса гриппа в легких животных на 14 сутки после заражения повышенное количество ингибиторной активности в легких (11,7мг/мл) и крайне низкое в крови (2,167 мг/мл). В шестой группе прошедшей курс светолечения, у выживших мышей в легких не наблюдалась, ингибиторная активность, в то же время в сыворотке крови определяется подъем ингибиторной активности до 130,970 мг/мл.

Таким образом, у животных получивших курс светолечения и выживших после смертельной и терапевтической доз вируса гриппа в сыворотке крови отмечался подъем ингибиторной активности не зависимо от дозы заражения.

Как показали наши исследования, гемагглютинирующая активность в легких белых мышей первой группы, предварительно зараженных летальной дозой вируса гриппа AP/R/8/34, резко поднималась и ко вторым суткам достигала максимального увеличения (1:512). В дальнейшем гемагглютинирующая активность медленно понижалась и к шестым суткам, когда погибали все животные, составляла 1:20. Инфекционный титр вируса гриппа зараженных легких ко вторым суткам достигал максимальной величины (10^6). В последующие сроки титр медленно понижался. Когда происходила 100% гибель мышей на шестые сутки инфекционный титр составлял 10^2 . С пятых суток после заражения инфекционный титр вируса гриппа был выше титра гемагглютинина.

Таким образом, при заражении белых мышей летальной дозой вируса гриппа AP/R/8/34, происходило быстрое накопление инфекционной и гемагглютинирующей активности, которое приводило к стопроцентной гибели животных на шестые сутки после заражения.

Гемагглютинирующая (1:256) и инфекционная активность (10^5) макси-

мального количества достигала к третьим суткам после заражения. На пятые сутки после заражения, когда начинали гибнуть животные гемагглютинирующая и инфекционная активность оставались на том же уровне /1:20/, что и в первой группе. На седьмые сутки гемагглютинирующая и инфекционная активность не определялись.

Таким образом, светолечение поляризованным, полихроматическим светом, животных предварительно зараженных смертельной дозой вируса гриппа А, задерживало размножение вируса гриппа на сутки. Инфекционная и гемагглютинирующая активность была ниже по сравнению с контрольной (1) группой. 20% животных оставались живы и на 14 сутки после заражения, в то время как в контрольной группе 100% гибель животных происходила на шестые сутки после заражения.

В контрольной группе (б) 50% гибель животных наступала на шестые сутки. На 14 сутки после заражения оставались живы 50% животных, у которых инфекционный титр вируса в легких был 10^{-3} и в сыворотке крови был 10^{-4} . Гемагглютинирующая активность в легких была в титре 1:40 а в сыворотке крови была в титре 1:80.

В седьмой группе белых мышей, которые прошли курс светотерапии предварительно зараженных терапевтической дозой вируса гриппа, 80% животных оставались, живы и на 15 сутки после заражения. В легких и в сыворотке крови леченных животных отмечалась как инфекционная, так и гемагглютинирующая активность в незначительных количествах (10^{-1} , ГА 1:2), особенно в сыворотке крови (10^{-2} , ГА 1:4).

Таким образом при заражении белых мышей, терапевтической /сублетальной/ дозой вируса гриппа А и прошедших курс светотерапии поляризованным, полихромным лучом 80% животных оставались живыми.

ВЫВОДЫ

1. Под действием смертельной дозы вируса гриппа А происходило быстрое накопление инфекционной и гемагглютинирующей активности, которое приводило к 100% гибели животных на шестые сутки после заражения.
2. Подавление протеазной и ингибиторной активности происходило в период максимального накопления инфекционной и гемагглютинирующей активности.
3. В группах животных прошедших курс светотерапии /18 сеансов/ поляризованным, полихроматическим, некогерентным светом, предварительно зараженных смертельной дозой вируса гриппа, 20% животных выживали и оставались живы на 15 сутки после заражения. Под действием терапевтической (сублетальной) дозы - 80% выживали и оставались живы на весь период исследований.

4. У животных контрольных групп, вирус гриппа А и полиризованный, полихроматический, некогерентный свет подавлял как протеазную так и ингибиторную активность.
5. У животных прошедших курс светолечения на 15 сутки после заражения наблюдался подъем ингибиторной активности не зависимо от дозы заражения.
6. Светолечение полиризованным, полихроматическим, некогерентным светом животных зараженных летальной дозой вируса гриппа задерживало активность размножение вируса. Инфекционная и гемагглютинирующая активность определялась в незначительных количествах т.е. под действием ПАЙЛЕР - света вирус гриппа А не погибал, а тормозилось его размножение. За этот период происходило восстановление ингибиторной /защитной/ активности и животные выживали.
7. В легких белых мышей, зараженных смертельной дозой вируса гриппа происходило повышение общего белка в начале развития инфекции, а к гибели животных количество белка резко снижалось. В тоже время под действием сублетальной дозы изменений белка не наблюдалось.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ:

1. М.К.Топчий, Н.П.Корношенко. 1967 г. //Руководство к практическим занятием по вирусологии, гл-ва Серологические методы исследований. Издательство Киевского университета, стр. 129-137.
2. К.Н.Веремеенко. 1980 // Кн. Ферменты в отоларингологии под редакцией К.Н.Веремеенко. Киев, стр. 147-149
3. С.В.Вовчук. 1979 // Сб. Биохимические методы исследования селекционного материала. Выпуск XI, Одесса, стр.59-67
4. А.П.Левицкий 1974 // Пищеварительные ферменты слюнных желез. Автореферат диссертации доктора медицинских наук. Одесса.
5. W.Lowry, Baker F. 1951 // Protein measurement with the Folin reagent./ J.Biol. Chem. 193 v.265-275.