

обмена веществ у продуктивных животных / М. И. Рецкий [и др.]. - Воронеж : ГНУ ВНИВИПФиТ. – 2005. – С. 44–94. 11. Некоторые показатели иммуно-биохимического статуса свиноматок при воспалительных процессах в репродуктивных органах / Ю. Н. Бригадиров [и др.] // Российский ветеринарный журнал. – 2018. – № 1. – С. 9–11.

Статья передана в печать 21.11.2019 г.

УДК 619:615.37

АНТИОКСИДАНТНАЯ ЗАЩИТА ЛИМФОЦИТОВ БАКТЕРИАЛЬНЫМИ ИММУНОСТИМУЛЯТОРАМИ

*Бушмакина И.М., *Мартынова М.А., **Красочко П.А., *Молчан М.М., ***Борисовец Д.С.

*ГНУ «Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси», г. Минск, Республика Беларусь

**УО «Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины», г. Витебск, Республика Беларусь

***РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского», г. Минск, Республика Беларусь

*Изучено влияние нового иммуностимулятора бактериальной природы «Иммуновир» на развитие процессов пероксидного окисления липидов (ПОЛ) и микровязкость мембран лимфоцитов крови. Установлено, что иммуностимулятор, созданный на основе липополисахаридов из штамма № 22 бактерий *Bacillus subtilis*, значительно подавляет процессы ПОЛ и стабилизирует мембраны в иммунокомпетентных клетках, не уступая антиокислительному эффекту известного коммерческого препарата «Альвеозан». **Ключевые слова:** Альвеозан, Иммуновир, микровязкость клеточных мембран, пероксидное окисление липидов.*

ANTIOXIDANT PROTECTION OF LYMPHOCYTES BY BACTERIAL IMMUNOSTIMULATORS

*Bushmakina I.M., *Martynova M.A., **Krasochko P.A., *Molchan M.M., ***Borisovets D.S.

*The Institute of Biophysics and Cell Engineering, National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus

**Vitebsk State Academy of Veterinary Medicine, Vitebsk, Republic of Belarus

***Republican Scientific-Research Subsidiary Unitary Enterprise «Institute of Experimental Veterinary Medicine named by S.N. Vyshellessky», Minsk, Republic of Belarus

*The effect of the new bacterial immunostimulator «Immunovir» on lipid peroxidation and microviscosity of lymphocyte membranes was studied. It has been established that the immunostimulator making on the base of lipopolysaccharide from strain № 22 bacteria *Bacillus subtilis* significantly inhibits of free-radical lipid peroxidation and stabilizes the membranes in immunocompetent cells. It should be noted that its antioxidant activity is comparable to that of known commercial medication «Alveozan». **Keywords:** Alveozan, Immunovir, microviscosity of cell membranes, lipid peroxidation.*

Введение. Иммунная система является одной из составляющих единиц, обеспечивающих функционирование организма в целом, поэтому расстройство функции иммунокомпетентных органов приводит к нарушениям гомеостаза, специфическим болезням, снижает общую сопротивляемость организма к различным патогенам и сопровождается рядом неспецифических проявлений, например, в случае ветеринарии, таких как задержка роста и развития молодняка, снижение продуктивности и функции размножения взрослых животных, угнетение репаративных процессов при повреждении. Зачастую этому способствуют нарушения в рационе животных, повышенное давление различных ксенобиотиков, вызванное ростом химизации сельскохозяйственного производства и т.п. В последние годы из-за нарушений содержания и эксплуатации животных у них рождается потомство с пониженным иммунным статусом, то есть с иммунодефицитом. Организм оказывается малоустойчивым к воздействию неблагоприятных факторов внешней среды, среди таких животных чаще возникают массовые заболевания, в том числе и инфекционного происхождения, и в целом развитие различных патологических процессов в организме животных, как правило, сопровождается возникновением иммунодефицита. В связи с этим решение проблемы невозможно без использования средств, повышающих иммунобиологическую защиту организма. То есть для коррекции иммунодефицита необходимо использовать иммуностимуляторы, которые:

□ корректируют иммунный статус организма, повышают устойчивость к неблагоприятным факторам, усиливают иммунный ответ при вакцинации;

□ активизируют защитные силы организма, тем самым способствуют повышению эффективности многих лекарственных средств и, прежде всего, антимикробных, противовирусных и антипаразитарных препаратов;

□ способствуют лучшему заживлению ран, стимулируют процессы регенерации;

□ обладают ростостимулирующими свойствами;

□ оказывают адаптогенное действие и ослабляют влияние стрессов на организм.

Поскольку иммунная система организма является единой, то действие любого иммуностимулятора вызывает ответную реакцию всей системы, хотя для обезвреживания определенных патогенов достаточно мобилизации и включения только какого-то одного звена. При этом следует отметить, что для успешного поддержания здоровья животных применения одних иммуностимуляторов недостаточно. Их необходимо применять только в сочетании с комплексами витаминов, микроэлементов, при рациональном кормлении животных и использовании усвоенной вакцинации. Однако следует подчеркнуть, что в последние десятилетия все больше растет влияние различных техногенных факторов на организм, что приводит к появлению системных патологий, которые требуют корректировки с помощью различных лекарственных средств. В связи с этим в фармакологии появились новые направления: иммунофармакология и стрессофармакология. В настоящее время предложено очень много иммуностимуляторов и иммуномодуляторов, имеющих разные точки приложения и различный механизм действия, но оказывающих выраженное влияние на иммунный ответ.

Иммунобиологическая защита организма в основном проводится в двух главных направлениях: применение иммуномодуляторов одновременно с вакцинопрофилактикой и регулирование иммунологической реактивности организма с помощью неспецифической стимуляции иммунного ответа.

Благодаря развитию иммунологии, микробиологии, химии, фармакологии и других наук в настоящее время предложено громадное количество соединений, которые способны активировать иммунокомпетентные клетки – макрофаги, различные субпопуляции лимфоцитов, а также гуморальные факторы иммунной системы – комплемент, пропердин, интерферон, лизоцим, нормальные антитела. Эта способность является общей для всех препаратов подобного ряда. Подчеркнем, что особенно важным свойством их является иммуностимулирующее воздействие на гуморальные факторы иммунитета. Иммуностимуляторы усиливают синтез иммуноглобулинов, повышают бактерицидную, комплементарную, лизоцимную активность сыворотки крови животных, активизируют ее пропердиновую систему.

Следует отметить, что в настоящее время используются иммуномодуляторы и иммуностимуляторы комплексного действия, у которых помимо прямого назначения важны и другие, вспомогательные функции. Например, при инфекциях, сопровождающихся поражением желудочно-кишечного тракта, большое значение имеет обезвреживание токсинов, обильно поступающих в организм в связи с дисфункцией кишечника. То есть современные иммуностимулирующие препараты не только оказывают влияние на процессы иммуногенеза, но и обладают детоксикационным, гепатопротекторным действием и антиоксидантным эффектом [1, 2].

В настоящее время в ветеринарной практике используется широкий спектр различных иммуностимуляторов, однако создание нового отечественного эффективного, приемлемого по цене комплексного иммуностимулятора для профилактики и терапии вирусных и паразитарных болезней животных остается чрезвычайно важной практической задачей.

В РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского» создан новый бактериальный иммуностимулятор для ветеринарии «Иммуновир» на основе липополисахаридов штамма № 22 бактерий *Bacillus subtilis*. Данный препарат относится к сегменту биологических иммуностимуляторов, включающих в себя наряду с препаратами бактериальной природы дериваты дрожжей и грибов (зимозан, глюкан), препараты растительного происхождения (экстракты элеутерококка, женьшеня, алоэ, родиолы розовой, хлорофиллин, оксидат торфа), продукты пчеловодства, препараты животного происхождения (тималин, тимоген, взвесь плаценты и т. д.) [3].

Как было указано выше, среди широкого спектра действия современных комплексных иммуностимуляторов значительную роль играют антиоксидантные эффекты таких препаратов. Известно, что небольшая часть кислорода, поступающего из воздуха в организм, превращается в активные формы – свободные радикалы, обладающие высокой химической активностью и вызывающие окисление белков, липидов, нуклеиновых кислот, причем наиболее быстро окислительной деструкции подвергаются липидные компоненты клеток. Основным субстратом пероксидного окисления липидов (ПОЛ) являются полиненасыщенные цепи жирных кислот, входящих в состав липидов клеточных мембран и липопротеинов плазмы крови. В норме в организме функционирует эффективная многоуровневая система ингибирования пероксидного окисления липидов. Вследствие этого в нормальных условиях существует некое равновесное состояние между данной системой и интенсивностью свободнорадикальных реакций. Однако активизация процессов образования активных форм кислорода приводит к развитию патологий и сопровождается эти процессы. Ряд авторов полагает, что при иммунодефицитных состояниях иммуностимуляторы способствуют защите Т- и В-лимфоцитов от угнетающего действия свободных радикалов и, как следствие, нормализуют активность иммунной системы, кроме того, они способны перехватывать свободные радикалы и снижать накопление продуктов ПОЛ [4].

Цель работы – провести сравнительное исследование влияния двух иммуностимуляторов на протекание процессов ПОЛ и микровязкость плазматических мембран лимфоцитов крови животных.

Материалы и методы исследований. В экспериментах принимали участие два иммуностимулятора: новый бактериальный иммуностимулятор из штамма № 22 бактерий *Bac. subtilis* под названием «Иммуновир», любезно предоставленный РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского», и коммерческий препарат «Альвеозан». В качестве подопытных животных использовали морских свинок.

К 100 мкл крови добавляли 2 мл среды RPMI 1640, содержащей 10% эмбриональной сыворотки телят, 1% L-глутамин и 0,1% гентамицина сульфата. Затем в пробы вносили по 200 мкл исследуемых иммуностимуляторов в концентрации 500 мкг/мл. Образцы культивировали в течение 4 суток при 37 °С в присутствии 5% CO₂ в суховоздушном CO₂-инкубаторе HERAcell 150. Лимфоциты из крови исследуемых животных выделяли способом центрифугирования в градиенте плотности фиколл-урографина.

Первая серия экспериментов предусматривала выделение лимфоцитов после инкубации цельной крови, обработанной иммуностимуляторами, и последующее определение интенсивности протекания процессов ПОЛ в клетках. В другой серии экспериментов из цельной крови предварительно выделяли лимфоцитарную фракцию, которую далее инкубировали с исследуемыми препаратами, после чего регистрировали накопление продуктов ПОЛ.

Накопление продуктов ПОЛ определяли с помощью тиобарбитуровой кислоты (ТБК-теста) и рассчитывали по количеству образовавшегося малонового диальдегида (МДА).

Степень микровязкости лимфоцитарных мембран определяли по результатам измерения поляризации флуоресценции липофильного зонда 1,6-дифенил-3,5-гексатриена (ДФГТ; Serva), встроенного в клеточные мембраны. Зонд вводили в суспензию клеток в растворе тетрагидрофурана и инкубировали при температуре 37°C в течение 90 мин. Конечная концентрация ДФГТ в пробах составляла 1 мкМ. Были использованы длины волн возбуждения и регистрации флуоресценции: $\lambda_{\text{возб}} = 355 \text{ нм}$, $\lambda_{\text{фл}} = 430 \text{ нм}$. Флуоресцентные измерения проводили на спектрофлуориметре Solar SFL 1211 (Беларусь).

С целью получения статистически достоверных значений измеряемых величин опыты проводили не менее 5 раз. Для статистической обработки экспериментальных данных использовали «Microsoft Excel 2010».

Результаты исследований. Было установлено, что исследуемые иммуностимуляторы эффективно ингибируют протекание процессов ПОЛ (рисунок 1). Показано, что концентрация ТБК-активных продуктов в лимфоцитах, выделенных после обработки иммуностимуляторами цельной крови, снижается на 38-40% как в случае применения иммуновира, так и в случае альвеозана, по сравнению с контролем, где концентрация МДА составляет $0,346 \pm 0,035 \text{ мкМ}$. В то же время при инкубации выделенных иммунокомпетентных клеток с иммуностимуляторами антиоксидантный эффект исследуемых препаратов выражен существенно больше: обработка лимфоцитов липополисахаридами штамма № 22 *Bac. subtilis* приводит к падению уровня МДА в среднем на 60,5%, а обработка клеток альвеозаном – на 54,5%. Следует отметить тот факт, что в этом случае уровень ТБК-активных продуктов в контрольных образцах исходно ниже и составляет $0,266 \pm 0,018 \text{ мкМ}$.

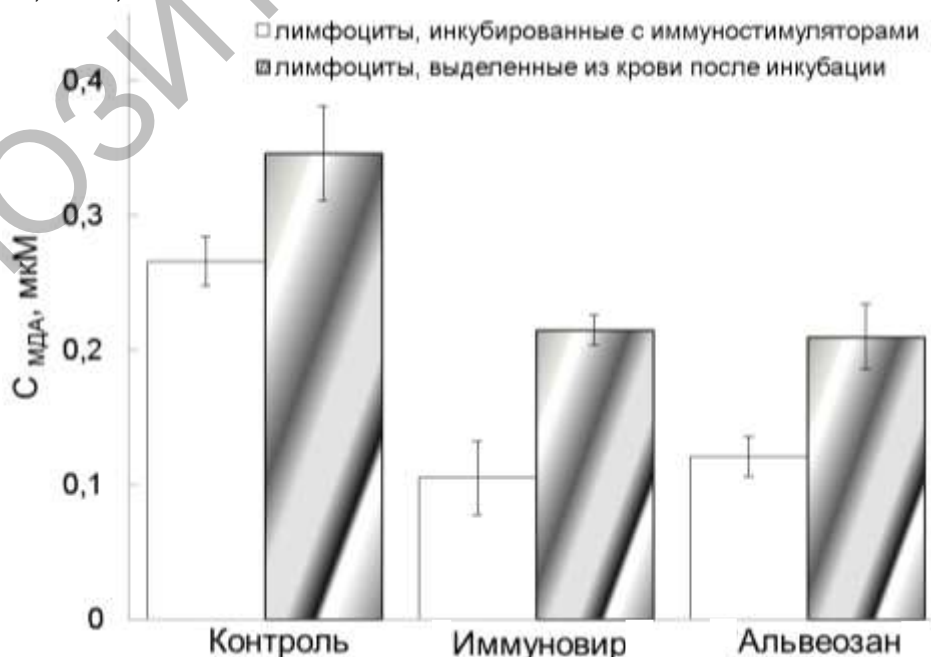


Рисунок 1 – Влияние иммуностимуляторов на накопление ТБК-активных продуктов (малонового диальдегида) в лимфоцитарной фракции крови

По данным литературы известно, что зачастую антиоксидантный эффект обусловлен стабилизацией клеточных мембран, при этом важную роль играет структурно-механический фактор [5]. Другими словами, некоторые соединения способны повышать степень упорядоченной организации и снижать скорость движения углеводородных цепей фосфолипидов, являющихся основным липидным компонентом плазматической мембраны клетки, т.е. повышать микровязкость мембран.

Установлено, что в случае обработки иммуностимуляторами цельной крови в контрольных образцах (без использования иммуностимуляторов) степень поляризации флуоресценции ДФГТ в мембранах лимфоцитов составляет $0,219 \pm 0,026$ (рисунок 2).

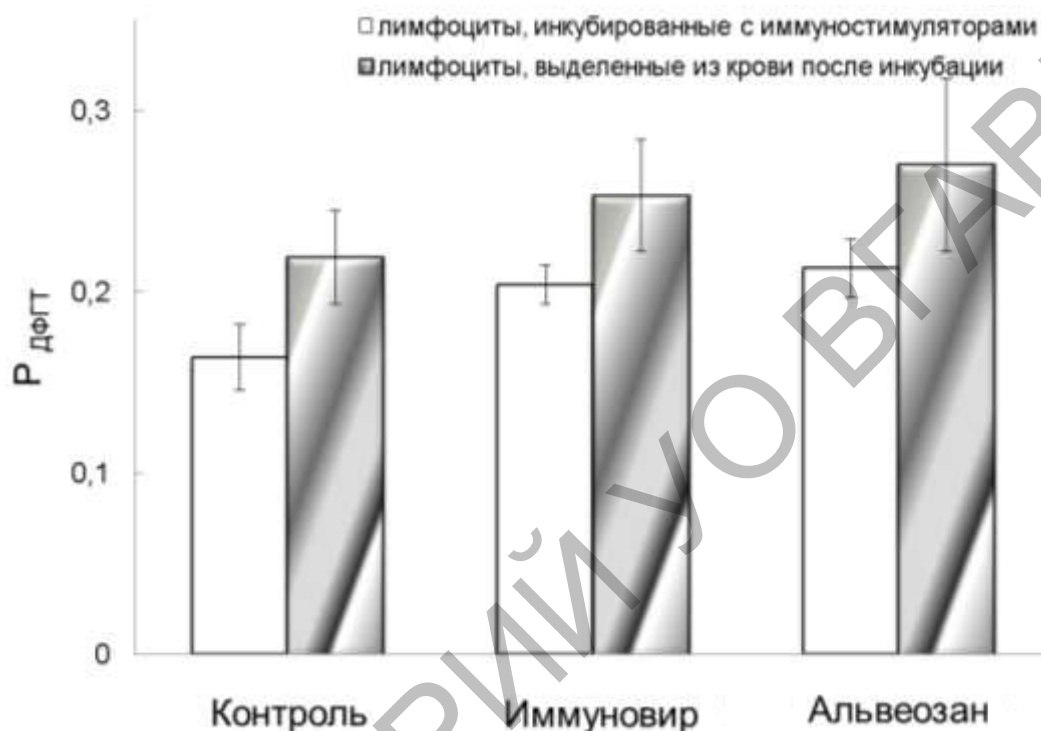


Рисунок 2 – Влияние иммуностимуляторов на микровязкость плазматических мембран в лимфоцитах крови морских свинок

При этом использование иммуностимуляторов приводит к повышению степени микровязкости клеточных мембран в среднем на 20,5% после обработки клеток препаратом «Иммуновир» и на 23,3% – после обработки препаратом «Альвеозан». Следует отметить, что достоверных различий в действии иммуностимуляторов на клетки крови самцов и самок животных не обнаружено, более значимо выражены индивидуальные различия физического состояния плазматических мембран клеток крови отдельных особей. В случае же обработки иммуностимуляторами выделенных лимфоцитов в контрольных образцах (без использования иммуностимуляторов) степень поляризации флуоресценции ДФГТ в мембранах лимфоцитов составляет $0,164 \pm 0,018$. Применение препарата «Иммуновир» упорядочивает упаковку мембранных компонентов в среднем на 24,4%, а применение альвеозана – на 29,8%.

Заключение. Таким образом, новый бактериальный иммуностимулятор, созданный на основе липополисахаридов штамма № 22 *Bac. subtilis*, значительно подавляет процессы свободнорадикального пероксидного окисления липидов в иммунокомпетентных клетках, при этом наблюдается увеличение микровязкости плазматических мембран в лимфоцитах крови животных. Причем следует отметить, что его антиоксидантная активность не уступает по антиоксидантным свойствам широко используемому коммерческому препарату «Альвеозан».

Литература. 1. Иммуномодуляторы в ветеринарной практике : применение и противоречия / А. В. Санин [и др.] // Волгоградский стоматологический портал [Электронный ресурс]. – Режим доступа : <https://www.vetlek.ru/articles>. – Опубликовано : 29.11.2015. 2. Петрова, Н. П. Изучение и применение новых комплексных иммуностимуляторов в свиноводстве : дис. ... к-та биол. Наук : 06.02.03, 06.02.02 / Н. П. Петрова. – Казань, 2014. – 140 с. 3. Красочко, П. Эффективность иммуномодуляторов при паразитарных болезнях животных / П. Красочко, М. Якубовский, А. Ятусевич // Ветеринария сельскохозяйственных животных. – 2011. – № 12. – С. 4-8. 4. Соколова, В. Д. Фармакология / В. Д. Соколова. – Санкт-Петербург : Издательство «Лань», 2010. – 576 с. 5. Бушмакина, И. М. XXI век: как изменились наши представления о липосомальных лекарственных средствах / И. М. Бушмакина, М. А. Мартынова, Е. В. Князева // Химико-фармацевтический журнал. – 2015. – Т. 49, № 2. – С. 41-49.

Статья передана в печать 25.10.2019 г.