



Увеличение: А – 36 000; Б, В – 140 000

А – без α -токоферол ацетата; Б – липосомы, содержащие витамин Е в концентрации идентичной коммерческому препарату «ЛипоКар»; В – липосомы, содержащие витамин Е в концентрации 0,16 мг/мг липидов

Рисунок 5 – Электронные фотографии свежеприготовленных мультиламеллярных липосом с инкорпорированным β -каротином, различающихся содержанием витамина Е

Была изучена степень антиоксидантной защиты различных концентраций альфа-токоферол ацетата в субстанции липосомального β -каротина. При использовании α -токоферол ацетата в концентрации 0,08 мг/мг суммарных липидов снижение количества ТБК-активных продуктов по сравнению с контролем отмечалось более чем в 2 раза, а при его концентрации 0,16 мг/мг суммарных липидов наблюдалось падение накопления МДА почти в 25 раз.

В результате проведенных экспериментов определен оптимальный состав липосомообразующей композиции для получения мультиламеллярной липосомальной формы β -каротина методом вортэкспирования: соевый фосфатидилхолин и холестерин в молярном соотношении 10:1, витамин С в концентрации 1,375 мг/мл суспензии, провитамин А – 11 мг/мл суспензии и антиоксидант витамин Е в концентрации 0,16 мг/мг суммарных липидов. Однако важным показателем качества любого липосомального препарата является включение активного вещества в липосомы. Установлено, что эффективность инкорпорирования β -каротина в липосомы при таком оптимальном составе липосомообразующей смеси достигает 100% от исходно внесенного в инкубационную смесь.

Закключение. Таким образом, установлен оптимальный состав липосомообразующей композиции, включающей основные и минорные стабилизирующие бислои компоненты, для инкорпорирования β -каротина (провитамина А) в липосомы методом вортэкспирования.

Литература. 1. Макарецов, Н. Г. Кормление сельскохозяйственных животных : учебник для вузов / Н. Г. Макарецов. – 4-е изд., перераб. и доп. – Калуга : Нофосфера, 2017. – 640 с. 2. 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. 3. Бангэм, А. Д. Развитие представлений о липосомах / А. Д. Бангэм // Липосомы в биологических системах : пер. с англ. / А. Д. Бангэм [и др.] ; под ред. Г. Грегориадиса, А. Аллисона. – Москва, 1983. – С. 13–35. 4. Бушмакина, И. М. Инкорпорирование жирнокислотного комплекса «биен» в мультиламеллярные липосомы / И. М. Бушмакина, Н. И. Дроздова, М. А. Мартынова // Биомедицинская химия. – 2009. – Т. 55, – № 2. – С. 177–184.

Поступила в редакцию 30.04.2020 г.

УДК 619:616.34-002:615.246:636.2.053

**МЕТОДОЛОГИЯ ДЕАКТИВАЦИИ ЛЕКТИНОВОЙ АКТИВНОСТИ В КОРМАХ
НА ОСНОВЕ ИХ УГЛЕВОДНОЙ СПЕЦИФИЧНОСТИ**

***Добровольский С.А., **Кубарев В.С., *Коваленок Ю.К., *Коваленок Н.П., *Напреенко А.В.,
***Сепп А.Л.

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

**ЧПУП «Будагово-биотехагро», аг. Будагово, Республика Беларусь

***ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургская государственная академия ветеринарной медицины»,
г. Санкт-Петербург, Российская Федерация

*Разные сорта люпина обладают избирательной специфичностью лектинов к основанным на глюкозе олигосахаридам и моносахарам. Установлено, что смеси грубых экстрактов белков люпина, содержащих лектины, проявляют выраженную поливалентность к таким углеводным конъюгатам, как D-глюкоза, D-мальтоза, D-ксилоза, D-манноза. Отмечено, что метасиликат натрия является одним из потенциальных соединений для деактивации лектиновой активности в кормах. Совокупность результатов позволяет выделить методическое направление механизмов нейтрализации лектинов в кормах. **Ключевые слова:** углеводы, лектин, люпин, агглютинация, корма, антипитательный фактор, метасиликат натрия.*

STUDY OF CARBOHYDRATE SPECIFICITY OF LUPINE LECTINS TO CREATE AN EFFECTIVE METHOD OF THEIR NEUTRALIZATION

***Dabravolski S.A., **Kubarev V.S., *Kavalionak Yu.K., *Kavalionak N.P., *Napreenka A.V.,
***Sepp A.L.

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

**PUE «Budagovo-biotechagro», Budagovo, Republic of Belarus

***Saint Petersburg State Academy of Veterinary Medicine, Saint Petersburg, Russian Federation

*Different varieties of lupine possess the selective specificity of lectins to glucose-based oligosaccharides and mono sugars. It was shown, that mixtures of crude lectin-containing proteins extracts of lupine exhibit pronounced polyvalency to carbohydrate conjugates such as D-glucose, D-maltose, D-xylose, D-mannose. It was noted, that sodium metasilicate is one of the potential compounds for the deactivation of lectin activity in the feed. In total, our results allow highlighting the methodological direction of the mechanisms of lectins' neutralization in the feed. **Keywords:** carbohydrates, lectin, lupine, agglutination, feed, anti-nutritional factor, sodium metasilicate.*

Введение. В природе растения подвержены влиянию различных неблагоприятных, в том числе и инфекционных, факторов внешней среды. Растения с течением времени выработали определенные защитные механизмы, одним из которых являются лектиновые белки, содержащиеся в больших количествах в некоторых органах той или иной растительной культуры [1-3, 6].

Способность распознавать и обратимо связывать специфические углеводные структуры является основной характеристикой лектиновых белков. Они весьма гетерогенны по своей структуре и свойствам: содержат от одного до нескольких сайтов связывания углеводов; некоторые лектины обладают очень слабой гемагглютинирующей способностью; многие лектины являются химерными белками, когда только один домен из нескольких проявляет лектиновую активность. Определение специфики взаимодействия лектинов с углеводами является одной из наиболее важных в изучении лектинов [8].

Следует отметить, что лектины многих растений являются термостабильными веществами, способными снижать питательную ценность кормов и провоцировать болезни у животных.

В свете вышеизложенного, изучение углеводной специфичности лектинов и их комплексобразующей активности является научно актуальной задачей [1, 2, 7], имеющей прикладное значение, что и определило цель настоящей работы.

Материалы и методы исследований. Работа выполнена на базе РУП «НПЦ НАН Беларуси по земледелию», кафедры клинической диагностики УО «Витебская ордена «Знак Почета» академия ветеринарной медицины» и ЧПУП «Будагово-биотехагро».

В исследованиях использовано несколько сортов люпина, так как эта культура входит в состав многих комбикормов и является важным источником белка.

В качестве ингибиторов реакции гемагглютинации для обнаружения углеводоспецифичности лектинов люпина использовались D-моносахара: D-галактоза, D-манноза, D-ксилоза, N-ацетил-D-галактозамин, D-маннит, D-мальтоза.

Определение аффинности лектинов изучаемых сельхозкультур к глюкозе и ее полимерам осуществлялось йод-крахмальной тест-системой [5]. Минимальная концентрация углевода, угнетающая активность определенного количества лектина при постановке реакции гемагглютинации в полистироловых планшетах являлась количественной характеристикой углеводной специфичности лектина.

Дополнительно было изучено воздействие метасиликата натрия и pH среды на активность лектиновых белков люпина.

Для анализа комплексобразующей активности лектинов использовалась эритроцитарная тест-система из эритроцитов крупного рогатого скота, которая приготавливалась по общепринятой методике [4].

Биометрический анализ полученных данных осуществляли с помощью статистических пакетов SAS 9.2, STATISTICA 9 и SPSS-19.

Результаты исследований. Установлено, что в результате реакции гемагглютинации, вызываемой лектинами люпина всех изучаемых в настоящем исследовании сортов и добавлением сахаров для угнетения этой реакции, менее всего гемагглютинацию угнетала D-Ксилоза. В то время как D-галактоза и N-ацетил-D-галактозамин существенно или полностью угнетали ге-

магглютинацию эритроцитов лектинами люпина. Данный результат указывает на то, что лектины люпина узколистного, образуя комплексы с углеводами, в основном распознают углеводы на основе D-галактозы. Обращает на себя внимание также и тот факт, что способность лектинов взаимодействовать с углеводами не зависит от сорта (Рэнчер, Митан и Надежда) люпина.

Наличие у исследуемых лектиновых белков экстракта различных сортов люпина углеводных доменов с помощью йод-крахмальной тест-системы представлено в таблице.

Таблица – Взаимодействие лектинов разных сортов люпина узколистного и декстринов йодкрахмальной тест-системы

Сорт	Последовательное разведение				
	1/1	2/1	4/1	8/1	16/1
Рэнчер	++++	+++	++	+	–
Митан	+++	++	+	–	–
Надежда	+++	++	+	+	–

Примечания: – полное отсутствие видимой реакции комплексообразования; + - значительное обесцвечивание раствора, осадка практически не наблюдается; ++ - сильное обесцвечивание раствора, в растворе наблюдается интенсивная муть; +++ - полное обесцвечивание раствора, хлопья на дне пробирки и в супернатанте; ++++ - полное обесцвечивание раствора с формированием мощного слоя осадка.

Из таблицы следует, что лектины изучаемых сортов люпина узколистного обладают различной комплексообразующей активностью по отношению к крахмалу, который является основным компонентом используемой тест-системы. Так как йод-крахмальная тест-система служит для определения наличия у лектиновых белков глюкозоузнающих сайтов, то на основании того, что способность формировать агрегаты с декстринами крахмала зависит от сорта, можно сделать заключение о том, что лектины всех изучаемых сортов люпина узколистного имеют различную аффинность к глюкозе.

Различие в способности взаимодействовать с мономерами глюкозы крахмала у изучаемых лектиновых белков проявляется в изменении прозрачности тест-системы, ее цвета, появлении хлопьев. В контроле изменений тест-системы не происходило, растворы оставались цветными и прозрачными. Интересным является то, что преципитирующая активность лектиновых белков по отношению к желатинизированному крахмалу тест-системы и способность вызывать ее внешние изменения соответствует устойчивости сорта к заболеванию антракнозом. Так, у более устойчивых к антракнозу сортов люпина узколистного преципитирующая активность лектиновых белков к крахмалу тест-системы значительно выше, чем у неустойчивых сортов либо у сортов со средней устойчивостью [1].

Разведение лектинового экстракта приводит к снижению активности лектиновых белков, что проявляется в интенсивности снижения образования хлопьев. Это можно объяснить тем, что при разведении лектинового экстракта в единице объема происходит снижение концентрации молекул лектинов, соответственно и преципитация декстринов крахмала при разведении экстрактов лектинов значительно снижается.

В литературе имеются сведения, что соединения кремния оказывают влияние на различные биологически активные белки. Метасиликат натрия ($\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$) широко применяется в народном хозяйстве, имеет хорошую растворимость в воде. Цикл исследований, посвященный влиянию метасиликата натрия на активность лектинов семян люпина узколистного, показал различные результаты. Так, наши исследования показали, что в реакционной среде, содержащей 0,025 М метасиликата натрия, активность лектинов люпина узколистного семян сорта Рэнчер снизилась до 128 ГАЕ/см³ с последующим снижением гемагглютинирующей активности с повышением концентрации метасиликата натрия. Метасиликат натрия также приводит к снижению гемагглютинирующей активности лектинов семян сорта Митан до 53,4 ГАЕ/см³ и даже до минимального значения в 3 ГАЕ/см³ в присутствии 0,25 М $\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$. Действие метасиликата натрия на семена люпина сорта Надежда привело к снижению гемагглютинирующей активности лектинов до 12,6 ГАЕ/см³.

Нами установлено, что увеличение концентрации $\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ приводило к заметному снижению активности лектинов всех изучаемых сортов. При концентрации метасиликата натрия выше, чем 0,25 М происходила спонтанная агглютинация эритроцитов из-за высокого значения pH.

Следует отметить, что для определения молекулярного механизма воздействия метасиликата натрия на лектиновые белки необходимы дальнейшие исследования, так как применение данного вещества открывает возможности к модификации и контролю гемагглютинирующей активности лектинов.

Ряд экспериментов с применением буферно-солевых растворов, не содержащих $\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$, но имеющих те же значения pH, что и в описанных выше экспериментах, осуществлялся для оценки влияния уровня pH среды на активность лектинов люпина узколистного. Отмечено, что в щелочном диапазоне pH (10,15-10,80) гемагглютинирующая активность лектинов люпина сорта Рэнчер находится на плато (128 ГАЕ/см³), а за последующим резким повышением активности до 256 ГАЕ/см³ следует резкая спонтанная агглютинация. Щелочной диапазон pH (10,15-10,80) также благоприятен для гемагглютинирующей активности лектинов люпина сорта Митан (52,4 ГАЕ/см³), а за последующим резким повышением активности до 64,2 ГАЕ/см³ следует резкая спонтанная агглютинация. Активность лектинов люпина сорта Надежда минимальна у изученных сортов – 12,6 ГАЕ/см³, даже в оптимальном щелочном диапазоне pH (10,15-10,80). Уже описанное резкое повышение активности при увеличении pH до 10,95 также характерно и для лектинов этого сорта – 21,5 ГАЕ/см³ с последующей резкой спонтанной агглютинацией.

Результаты исследований демонстрируют, что при pH среды в интервале 7,20-10,15 происходит увеличение гемагглютинирующей активности лектинов семян люпина. Однако при изменении pH среды в интервале 10,15-10,80 дальнейшего изменения не происходит. В интервале pH среды от 10,80-10,95 отмечено дальнейшее увеличение активности лектиновых белков. При pH среды 11,05 происходит спонтанная агглютинация эритроцитов тест-системы.

Анализ полученных данных позволяет сделать вывод о том, что наблюдавшееся в экспериментах с метасиликатом натрия снижение активности лектинов люпина обусловлено, прежде всего, наличием именно этого вещества в реакционной среде; т.е. снижение активности лектинов вызвано не повышением pH среды, происходящим при возрастании концентрации метасиликата натрия. Вероятно, использование более высоких концентраций метасиликата натрия привело бы к дальнейшему уменьшению активности лектинов люпина, но установить это при помощи реакции агглютинации эритроцитов не представляется возможным.

Таким образом, при добавлении в среду метасиликата натрия на активность лектинов люпина одновременно оказывают влияние следующие два фактора: ингибирующее воздействие метасиликата натрия в качестве химического реагента и увеличение pH среды (приводящее к увеличению активности лектинов). Так, например, при концентрации $\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ 0,025 М первый фактор уступает второму, что выражается в итоговом увеличении активности лектинов. При концентрации 0,075 М влияние этих факторов уравнивается, а при более высоких концентрациях (0,15 и 0,25 М) наблюдается снижение активности лектинов.

Обобщая полученные результаты, отметим, что метасиликат натрия обладает способностью снижать активность лектинов из семян люпина узколистного, при этом сорт значения не имеет. Есть большая вероятность того, что механизм этого явления связан со свойством кремниевой кислоты, которая образуется в растворе при гидролизе метасиликата натрия. Происходит формирование химических связей с различными частями молекулы лектинов, вызывая существенное изменение ее конформации, что в результате и приводит к инактивации лектинов. Однако обработка метасиликатом натрия приводит к значительному увеличению pH среды, что нежелательно при производстве из люпина продуктов кормового и пищевого назначения. Как показал эксперимент, кремниевая кислота имеет свойство инактивировать лектины, не вызывая существенного изменения pH среды, поэтому она была выбрана в качестве реагента.

Закключение. Смеси грубых экстрактов белков люпина, содержащих лектины, проявляют выраженную поливалентность к таким углеводным конъюгатам, как D-глюкоза, D-мальтоза, D-ксилоза, D-манноза. Известно, что мембрана животных организмов имеет в своей структуре гликоконъюгаты с D-моносахарами, из которых глюкоза, мальтоза и ксилоза являются основными составляющими в структуре гликокаликса эритроцитов кишечника. Установлено, что оптимальной средой для комплексообразования является щелочная среда с высоким pH. Также выявлено, что метасиликат натрия обладает способностью снижать лектиновую активность независимо от изменения pH раствора и, таким образом, является одним из потенциальных соединений для деактивации лектиновой активности в кормах.

Литература. 1. Комплексообразующая активность лектинов люпина узколистного, как фактор ответа на инфицирование антракнозом / Ю. К. Коваленок [и др.] // Ученые записки учреждения образования «Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины»: научно-практический журнал. – Витебск, 2019. – Т. 55, вып. 1. – С. 36–39. 2. Коваленок, Ю. К. Совершенствование способов лечения и профилактики микроэлементозов продуктивных животных / Ю. К. Коваленок // Ученые записки учреждения образования «Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины»: научно-практический журнал. – Витебск, 2007. – Т. 43, вып.1. – С. 105–108. 3. Коваленок, Ю. К. Устройство для изучения всасываемости веществ кишечником животных / Ю. К. Коваленок // Международный вестник ветеринарии. – 2012. – № 1. – С. 16–20. 4. Корсун, В. Ф. Фитолектины – руководство по клинической фитотерапии: учебное пособие для вузов / В. Ф. Корсун, В. М. Лахтин, Е. В. Корсун. – Москва: Высшая школа, 2007. – 273 с. 5. Луцки, А. Д. Лектины в гистохимии / А. Д. Луцки, Е. С. Детюк, М. Д. Луцки. – Львов: Выща школа, 1989. – С. 142. 6. Lanno, N. Lectin do-

mains at the frontiers of plant defense / N. Lannoo, E. J. M. Van Damme // Front. Plant Sci. – 2014. – Vol. 5. – P. 397. doi: 10.3389/fpls.2014.00397. 7. Van Holle, S. Messages from the past: New insights in plant lectin evolution / S. Van Holle, E. J. M. Van Damme // Front. Plant Sci. – 2019. – Vol. 10. – P. 36. doi: 10.3389/fpls.2019.00036. 8. Van Holle, S. Signaling through plant lectins: modulation of plant immunity and beyond / S. Van Holle, E. J. M. Van Damme // Biochem. Soc. Trans. – 2018. – Vol. 36. – P. 221–247. doi: 10.1042/BST20170371.

Поступила в редакцию 30.04.2020 г.

УДК 619:616.98:632.2:612.117:615.37

БИОХИМИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ КРОВИ КОРОВ, ИММУНИЗИРОВАННЫХ АССОЦИИРОВАННЫМИ ВАКЦИНАМИ ПРОТИВ ВИРУСНО-БАКТЕРИАЛЬНЫХ ЭНТЕРИТОВ ТЕЛЯТ

Красочко П.А., Яромчик Я.П., Красочко П.П., Белко И.А., Морозов Д.Д.

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

*В статье приведены результаты биохимических исследований сывороток крови коров после проведения двукратной иммунизации ассоциированными вакцинами против вирусно-бактериальных энтеритов телят. Применение испытываемых биопрепаратов не вызывает изменений биохимических показателей крови у вакцинированных коров, как по отношению к группе контроля, так и в сопоставлении с общепринятыми референтными значениями, что указывает на безвредность разработанных ассоциированных вакцин на организм животных. **Ключевые слова:** вакцина, телята, сыворотка крови, инфекционные болезни.*

BIOCHEMICAL INDICATORS OF BLOOD SERUM IN COWS VACCINED BY ASSOCIATED VACCINES AGAINST VIRAL-BACTERIA ENTERITIS IN CALVES

Krasochko P.A., Yaromchik Y.P., Krasochko P.P., Belko I.A., Morozov D.D.

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

*The article presents the results of biochemical studies of blood serum in cows after vaccination of animals experimental samples associated vaccines against infection enteritis of calves. The use of test vaccines does not cause changes in the biochemical parameters of blood in vaccinated cows, both in relation to the control group and in comparison with accepted reference values, which indicates the harmlessness of the developed associated vaccines in animals. **Keywords:** vaccine, calves, serum of blood, infection diseases.*

Введение. Проведение детального эпизоотологического обследования в сельскохозяйственных организациях, где регистрируются массовые заболевания телят первых дней жизни с признаками поражения желудочно-кишечного тракта, указывает, что в большинстве случаев в неблагополучных пунктах устанавливают ассоциированные течения инфекционных болезней вирусной и бактериальной этиологии, характеризующиеся высокими процентами летальности [3, 7, 9].

На сегодняшний день специфическая профилактика инфекционных энтеритов телят первых дней жизни в Республике Беларусь в первую очередь основывается на вакцинации стельных коров, что позволяет значительно уменьшить количество случаев заболевания телят и не допустить широкого распространения инфекционных пневмоэнтеритов молодняка крупного рогатого скота [2, 7].

Выбор биопрепаратов должен проводиться согласно конкретной и прогнозируемой эпизоотической ситуации в каждом животноводческом предприятии и сельскохозяйственной организации, с обязательным учетом этиологической структуры выделенных возбудителей инфекционных болезней [3, 4, 7, 9].

При проведении скрининговых исследований по наиболее распространенным в последнее время факторным болезням молодняка крупного рогатого скота инфекционной этиологии, установлено, что, несмотря на проводимую массовую вакцинацию сухостойных коров против наиболее распространенных инфекционных болезней молодняка, продолжает удерживаться стабильный процент выделения от заболевших и павших новорожденных телят энтеропатогенных штаммов *E. coli*, сальмонелл, рота- и коронавирусов и других возбудителей факторных болезней [7, 9].

Одной из основных причин недостаточной профилактической эффективности применяемых биопрепаратов отечественного и зарубежного производства является их несоответствие по антигенному составу с циркулирующими в хозяйствах эпизоотическими штаммами. К примеру, вакцинные штаммы эшерихий, содержащие адгезивные антигены – K88, K99, F41 и 987P зачастую отсутствуют в ряде биофабричных вакцин. Так, адгезивный антиген A20 (Att25), который