

Красочко П.А., доктор ветеринарных и биологических наук, профессор

Ястребов А.С., доктор ветеринарных наук, доцент

Борисовец Д.С., кандидат ветеринарных наук

Яромчик Я.П., кандидат ветеринарных наук*

Гринчик И.Т., младший научный сотрудник

Андросик Л.Д., кандидат ветеринарных наук

РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышеслесского», г. Минск

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

ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ ОБРАЗЦОВ КОМПЛЕКСНОГО БИОЛОГИЧЕСКОГО ПРЕПАРАТА НА ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ КРОВИ ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ

Резюме

Изучено влияние двух образцов комплексного биологического препарата на основе интерферона, индуктора интерферона и иммуностимулятора на иммунологические показатели крови лабораторных животных.

Установлены оптимальные дозы действующих веществ в препаратах, применение которых приводит к достоверному увеличению в крови кроликов количества Т-лимфоцитов на 3,3 – 36,9%, В-лимфоцитов – на 8,8 – 65,8%, бактерицидной активности сыворотки крови – на 7,29 – 20,76% и лизоцимной активности – на 6,54 – 61,43% на 14-е и 21-е сутки после введения препарата.

Summary

The effect of the two samples of complex biological preparation based on interferon, interferon inducer and immunostimulant on blood immunological indices of laboratory animals was studied.

The optimal doses of the active ingredients in the preparation were determined, the use of which leads to a significant increase of T-lymphocytes in the blood of rabbits at 3.3 – 36.9%, B-lymphocytes – at 8.8 – 65.8%, bactericidal activity of blood serum – at 7.29 – 20.76% and lysozyme activity – at 6.54 – 61.43% at 14 and 21 days after administration.

Поступила в редакцию 22.03.2013 г.

ВВЕДЕНИЕ

В современной ветеринарии все шире применяются противовирусные препараты, использование которых при вирусных инфекциях должно избирательно и специфически подавлять репродукцию вирусов и не затрагивать процессы жизнедеятельности клеток и систем организма. Из известных в настоящее время средств противовирусного действия практическое применение смогли найти лишь отдельные, одними из которых являются интерфероны (ИФН). ИФН можно использовать введением готовых форм (экзогенная интерферонизация) и стимуляцией образования ИФН клетками организма под влиянием индукторов (эндогенная интерферонизация) [2].

Действие препаратов экзогенного ИФН, как правило, непродолжительно, они имеют ряд побочных эффектов, кроме того стоимость препаратов относительно высока. Альтернативой экзогенной интерферонизации

является применение индукторов синтеза эндогенных ИФН. Так, индукторы ИФН характеризуются хорошей биодоступностью, растворимы в биологических жидкостях, вызывают интерферонию в пределах физиологической концентрации, совместимы с назначением большинства лекарственных препаратов [4, 5].

В ряде исследований установлено, что клиническая эффективность иммуномодуляторов на основе рекомбинантных цитокинов возрастает при их сочетанном применении с другими препаратами данной группы [1, 3, 6].

Препараты, сочетающие в себе свойства иммуномодуляторов и противовирусные свойства, можно рекомендовать для лечения и профилактики инфекционных заболеваний, сопровождающихся иммунодефицитными состояниями. Очевидно, что ни один иммуномодулятор не может оказаться универсальным средством терапии вирусных инфекций,

но правильно подобранным сочетаниям указанных препаратов принадлежит будущее в иммунотерапии инфекционных заболеваний [6].

Целью настоящей работы явилось изучение влияния двух образцов комплексного биологического препарата на основе интерферона, индуктора интерферона и иммуностимулятора на иммунологические показатели крови лабораторных животных.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Для конструирования образцов комплексного биологического препарата (КБП) использовали интерферон свиной рекомбинантный (ИСР) производства ООО «Научно-производственный центр БелАгро-Ген» (Республика Беларусь, г. Горки), индуктор интерферона пролонгированного действия «Провест» производства ООО «Диафарм» (РФ) и иммуностимулятор «Альвеозан» производства РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского».

Было изготовлено два лабораторных образца препарата: первый – содержащий интерферон свиной рекомбинантный и альвеозан, второй – индуктор интерферона «Провест» и альвеозан.

Сначала образцы препарата готовили с расчетом того, чтобы дозы действующих веществ в обоих образцах препарата для лабораторных животных соответствовали дозам, указанным в инструкциях по их применению, и составляли: интерферона свиного рекомбинантного – $0,1 \text{ см}^3/\text{кг}$ ($1000 \text{ МЕ}/\text{кг}$), альвеозана – $4 \text{ мкг}/\text{кг}$, индуктора интерферона «Провест» – $0,3 \text{ мг}/\text{кг}$.

В дальнейшем для определения оптимальной дозы применения двух образцов комплексного биологического препарата проводили их испытания с повышением содержания действующих веществ в фиксированном объеме образцов препарата в 5 и 10 раз.

Стерильность образцов препарата определяли на питательных средах в соответствии с ГОСТ 28085-89 «Препараты биологические. Методы бактериологического контроля стерильности».

Безвредность и реактогенность препаратов определяли на 30 белых мышах живой массой 18–20 г, которых разделили на 2

опытные и 1 контрольную группы по 10 голов в каждой. Образцы препарата вводили мышам опытных групп в дозе по $0,5 \text{ см}^3$. Десяти мышам группы контроля вводили физраствор в том же объеме.

Для изучения влияния двух образцов комплексного биологического препарата на иммунологические показатели крови исследования проводили на 21 кролике живой массой 2,5–3 кг, которых разделили на 7 групп (6 опытных и одна контрольная) по три головы в каждой группе. Первый экспериментальный образец КБП на основе индуктора интерферона «Провест» и альвеозана вводили кроликам 1-ой опытной группы внутримышечно однократно в дозе $1,0 \text{ см}^3$ на голову. Животным 2-ой и 3-ей опытных групп – внутримышечно однократно в дозе $1,0 \text{ см}^3$ на голову вводили образцы КБП с теми же действующими компонентами, но с увеличением концентрации в 5–10 раз. Второй экспериментальный образец КБП на основе интерферона свиного рекомбинантного и альвеозана вводили животным 4-ой опытной группы внутримышечно трехкратно в дозе $1,0 \text{ см}^3$ на голову в течение 3-х дней. Кроликам 5-ой и 6-ой опытных групп вводили внутримышечно трехкратно в дозе $1,0 \text{ см}^3$ на голову в течение 3-х дней образцы КБП на основе интерферона свиного рекомбинантного и альвеозана, в которых содержание действующих веществ также было увеличено в 5 и 10 раз. Животным контрольной группы вводили стерильный физиологический раствор в объеме $1,0 \text{ см}^3$.

Наблюдение за животными проводилось в течение 30 суток после введения препарата. При этом учитывали их поведение (возбуждение или угнетение), внешний вид, аппетит, жажду, степень проявления реакции на внешние раздражители.

До введения препаратов, через 14 и 21 день после иммунизации у кроликов опытных и контрольной групп отбирали пробы крови, часть которой стабилизировали гепарином, а часть использовали для получения сыворотки. В стабилизированной крови определяли количество Т- и В-лимфоцитов методом розеткообразования со стабилизированными эритроцитами барана и мыши по Д.К. Новикову и В.И. Новиковой (1979); в сыворотке крови – бактерицидную активность по Смирновой и Кузьминой (1968) и лизоцимную активность по Дорофейчуку (1966). Статистическую обработку результатов проводили с

использованием компьютерных программ StatBiom 2730 и Excel.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

При контроле изготовленных лабораторных образцов КБП на стерильность путём их посева на питательные среды МПА, МПБ, Сабуро, Китт-Тароцци и наблюдения в течение 10 суток не отмечено роста бактерий и грибов. Пробирки с питательными средами и посевами исследуемых образцов оставались без изменений (цвет, наличие осадка и т.д.), что свидетельствует о стерильности комплексного препарата.

При определении безвредности и реактогенности на лабораторных животных в течение 10 дней наблюдения изменений в их клиническом состоянии не выявлено. Белые мыши в опытных и контрольной группах оставались живыми, их поведенческие реакции не изменялись, что подтверждает безвредность и ареактогенность изготовленных образцов КБП.

Результаты изучения влияния образцов комплексного биологического препарата на показатели неспецифической резистентности организма лабораторных животных представлены в таблицах 1 и 2.

Таблица 1 – Лизоцимная активность сыворотки крови (ЛАСК) кроликов после введения образцов комплексного биологического препарата, %

Группа животных	Срок взятия крови		
	до введения препаратов	через 14 суток	через 21 сутки
опытная группа 1	3,76±0,03	6,07±0,33*	5,24±0,01
опытная группа 2	3,87±0,47	5,32±0,69	5,08±0,28
опытная группа 3	5,02±0,01	5,58±0,03*	5,37±0,12
опытная группа 4	4,7±0,02	5,18±0,49	4,95±0,56
опытная группа 5	4,37±0,01	4,84±0,01	5,05±0,17
опытная группа 6	4,57±0,1	4,08±0,3	4,86±0,49
контрольная группа	4,68±0,15	4,85±0,15	4,12±0,64

Примечание – * $P \leq 0,05$

Проведенными исследованиями выявлено стимулирующее действие разработанных образцов препарата на активность лизоцима в крови кроликов. После введения первого образца комплексного биологического препарата на основе индуктора интерферона и иммуностимулятора отмечено достоверное ($P \leq 0,05$) в сравнении с контролем увеличение лизоцима в 1-ой и 3-ей опытных группах на 61,43 и 10,36% соответственно на 14 сутки опыта, а на 21 сутки уровень лизоцимной активности сыворотки крови незначительно снижался.

Применение второго образца комплексного биологического препарата на основе рекомбинантного интерферона и альвеоза привело к увеличению активности лизоцима на 10,21 и 10,75% на 14-е сутки после введения препарата в 4-ой и 5-ой опытных группах. На 21-е сутки исследования данный показатель возрос в 5-ой и 6-ой опытных группах на 15,56 и 6,54 % в сравнении с исходным уровнем, однако отмеченные изменения не являлись статистически достоверными (таблица 2).

Таблица 2 – Бактерицидная активность сыворотки крови (БАСК) кроликов после введения образцов комплексного биологического препарата, %

Группа животных	Срок взятия крови		
	до введения препаратов	через 14 суток	через 21 сутки
опытная группа 1	27,16±0,46	27,64±1,34	32,8±1,98*
опытная группа 2	20,83±2,2	25,12±0,28	23,46±1,46
опытная группа 3	23,33±2,03	25,2±0,75	27,78±0,81
опытная группа 4	29,23±3,22	28,16±1,09	31,36±1,76*
опытная группа 5	23,51±0,61	20,15±1,86	21,5±0,69
опытная группа 6	25,66±0,9	28,51±0,75	27,25±1,22
контрольная группа	26,11±0,85	24,78±1,46	23,77±1,29

Примечание – * $P \leq 0,05$

Установлено, что на 21 сутки после введения лабораторным животным образцов комплексных препаратов бактерицидная активность сыворотки крови повышалась, причём достоверные изменения ($P \leq 0,05$) наблюдались в 1-ой и 4-ой опытных группах на 20,76 и 7,29 % в сравнении с первоначальными значениями. При использовании образ-

цов с увеличенной концентрацией действующих веществ в 5 и 10 раз достоверных изменений бактерицидной активности сыворотки крови кроликов не выявлено.

Влияние образцов комплексного биологического препарата на клеточный иммунитет кроликов представлены в таблице 3.

Таблица 3 – Содержание Т- и В-лимфоцитов крови кроликов после введения образцов комплексного биологического препарата

Срок взятия крови	Группы животных	Показатель	
		Т-лимфоциты, %	В-лимфоциты, %
до иммунизации	опытная группа 1	45,33±0,88	22,33±0,33
	опытная группа 2	47±0,58	23,67±0,88
	опытная группа 3	50±1,0	25,33±0,67
	опытная группа 4	47,33±0,33	28±1,15
	опытная группа 5	44±0,58	18±1,15
	опытная группа 6	51±1,53	30,33±2,6
	контрольная	46±1,15	22±2,0
через 14 дней	опытная группа 1	49,33±0,88*	26,67±0,33*
	опытная группа 2	51±0,58**	25,33±0,88
	опытная группа 3	55,33±1,45**	30±1,52*
	опытная группа 4	49±0,58*	28±1,73*
	опытная группа 5	45±1,15	20,67±1,76
	опытная группа 6	52±1,0**	30,33±2,03*
	контрольная	44±1,0	21±1,53
через 21 день	опытная группа 1	60,33±0,67***	36,33±0,88**
	опытная группа 2	64,33±2,33**	37,67±0,88**
	опытная группа 3	66,33±1,2***	42±1,53**
	опытная группа 4	53±0,57**	33±1,53*
	опытная группа 5	49±2,51	24,67±2,9
	опытная группа 6	52,67±2,33*	33±1,15**
	контрольная	43,67±1,45	20,33±2,33

Примечание – * $P \leq 0,05$; ** – $P \leq 0,01$; *** – $P \leq 0,001$

При оценке влияния образцов КБП на показатели клеточного иммунитета кроликов установлено, что трехкратное введение препарата на основе индуктора интерферона «Провест» с альвеозаном приводило к достоверному увеличению количества Т-лимфоцитов на 8,5–10,7% ($P \leq 0,05$; $P \leq 0,01$) через 14 дней и на 32,7–36,9% ($P \leq 0,01$; $P \leq 0,001$) через 21 день после применения указанного образца. Количество В-лимфоцитов при этом достоверно ($P \leq 0,05$) увеличивалось на 14-е сутки в 1-ой и 3-ей опытных группах соответственно на 19,4 и 18,5%, а на 21 день после применения первого образца препарата – от 59,1 до 65,8% ($P \leq 0,01$).

При однократном парентеральном

введении кроликам комплексного биологического препарата на основе интерферона и альвеозана на 14-е сутки происходило значимое увеличение в 4-ой и 6-ой опытных группах Т-лимфоцитов на 3,5% ($P \leq 0,05$) и 2,0% ($P \leq 0,01$), а на 21 день – на 12,0% ($P \leq 0,01$) и 3,3% ($P \leq 0,05$) соответственно в сравнении с первоначальными показателями. Положительная динамика увеличения В-лимфоцитов в данных опытных группах наблюдалась в течение 21 суток исследования и характеризовалась достоверным увеличением их количества на 17,9% ($P \leq 0,05$) и 8,8% ($P \leq 0,01$). В то же время в 5-ой опытной группе достоверных изменений показателей клеточного иммунитета не наблюдалось.

Таким образом, было установлено, что увеличение в образцах препарата содержания действующих компонентов в 5 и 10 раз не приводило к существенному повышению уровня Т- и В-лимфоцитов, бактерицидной и лизоцимной активности сыворотки крови. Следовательно, оптимальными дозами действующих веществ в образцах препарата являются: интерферон – 0,1 см³/кг живой массы, индуктор интерферона – 0,3 мг/кг, альвеозан – 4–5 мкг/кг.

ВЫВОДЫ

1 Однократное введение кроликам комплексного биологического препарата на основе индуктора интерферона «Провест» и альвеозана сопровождается достоверным увеличением количества Т-лимфоцитов в крови кроликов на 32,7–36,9%, В-лимфоцитов – на 59,1 – 65,8%, бактерицидной активности сыворотки крови – на 20,76% на 21-й день, лизоцимной активности сыворотки крови – на 10,36 – 61,43% на 14-е сутки после введения препарата.

2 Парентеральное трехкратное с интервалом в 24 часа введение кроликам комплекс-

ного биологического препарата на основе интерферона свиного рекомбинантного и альвеозана сопровождается на 21-е сутки достоверным увеличением количества Т-лимфоцитов в крови на 3,3–12%, В-лимфоцитов – на 8,8–17,9%, БАСК – на 7,29%, ЛАСК – на 6,54 – 15,56%.

3 Увеличение концентрации действующих компонентов в образцах препарата в 5 и 10 раз не приводит к существенному повышению уровня Т- и В-лимфоцитов, бактерицидной и лизоцимной активности сыворотки крови. Оптимальные дозы действующих веществ в препарате составляют: для интерферона – 0,1 см³/кг живой массы, индуктора интерферона – 0,3 мг/кг, альвеозана – 4 – 5 мкг/кг.

4 Комплексный биологический препарат на основе индуктора интерферона пролонгированного действия «Провест» и иммуностимулятора «Альвеозан» обладает более выраженными иммуностимулирующими свойствами по сравнению с биологическим препаратом на основе интерферона свиного рекомбинантного с альвеозаном.

ЛИТЕРАТУРА

1 Аликин, Ю.С. Пролонгирование биологически активных веществ / Ю.С. Аликин [и др.] // Эпизоотология, диагностика, профилактика и меры борьбы с болезнями животных. - Новосибирск, 1997. – С. 228–235.

2 Гизатулина, С.Р. Сравнительная оценка применения интерферонов экзогенного и эндогенного воздействия при инфекционном ринотрахеите у телят / С.Р. Гизатулина // Ветеринарная патология. – 2003. – № 2. – С. 17–18.

3 Глотова, Т.И. Противовирусная активность рибавирина в сочетании с альфа-интерфероном в отношении вируса вирусной диареи - болезни слизистых крупного рогатого скота / Т.И.Глотова // Сб. науч. тр., посвящ. 70-

летию ДальЗНИВИ / Дальневост. зон. науч.-исслед. ветеринар. ин-т. – Краснообск, 2005. – С. 96–102.

4 Ершов, Ф.И. Интерфероны и их индукторы (от молекул до лекарств) / Ф.И. Ершов [и др.] // М.: ГЭОТАР-МЕДИА, 2005. – 368 с.

5 Особенности применения индукторов интерферона у больных остроконечным кандидоматозом аногенитальной области / Н.В. Шперлинг [и др.] // Казанский медицинский журнал. – 2008. – т. 89, № 6. – С. 811–814.

6 Санин, А.В. Применение иммуномодуляторов при вирусных заболеваниях мелких домашних животных / А.В. Санин // Российский журнал ветеринарной медицины. – 2005. – № 1 – С. 38–42.

ФЕНАЛЗОЛ

антгельминтик

**используется крупному и мелкому рогатому скоту
против фасциол, парамфистоматид, мониезий,
желудочно-кишечных и легочных нематод, телязий**