УДК 619:578.825.15:636:612.017:636.612.014.44

Красочко П.А., доктор ветеринарных и биологических наук, профессор*
Плавский В.Ю., заместитель директора по научной и инновационной работе**
Машеро В.А., – кандидат ветеринарных наук, доцент***
Красочко П.П. – аспирант ***
**РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н.Вышелесского»*
***ГНУ «Институт физики НАН Беларуси»*
****УО «Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины»*

РЕЗУЛЬТАТЫ ИЗУЧЕНИЯ МЕХАНИЗМА ИММУНОСТИМУЛИРУЮЩЕГО ДЕЙСТВИЯ ПОЛИХРОМАТИЧЕСКОГО ПОЛЯРИЗОВАННОГО СВЕТА

Резюме

Показано угнетающее действие полихроматического поляризованного света на репродукцию вируса инфекционного ринотрахеита крупного рогатого скота in vivo и in vitro и его стимулирующее действие на поствакцинальный иммунный ответ

Summary

A suppressive action of polychromatic polarised light on a reproduction of bovine herpesvirus in vivo and in vitro systems and its stimulating effect on a postvaccinal immune response are shown

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время вопрос о молекулярном механизме биологической активности низкоинтенсивного лазерного излучения (НИЛИ) остается открытым. Механизмы биологического действия лазерного излучения изучены недостаточно.

Экспериментальные данные и клиническая практика показывают, что низкоинтенсивное лазерное излучение активизирует системы неспецифической резистентности организма, эффекты лазерного воздействия аккумулируются от сеанса к сеансу.

На органном уровне под воздействием НИЛИ включаются механизмы межтканевых взаимодействий, среди которых ведущая роль принадлежит системе микроциркуляции крови. Фотоактивация рефлексогенных зон и зон акупунктуры ведет к вовлечению в рефлекторный ответ нервных и гуморальных механизмов регуляции.

Центральное место в клинико-экспериментальном обосновании лазерной терапии занимает вопрос об оптимальной длине волны и дозе лазерного воздействия, а также о роли поляризации и когерентности излучения в реализации его терапевтического действия. Мощ-ность излучения лазерных терапевтических аппаратов колеблется от долей милливатта до сотен милливатт. Из клинико-экспериментальных данных известно, что оптимальный диапазон интенсивностей лазерного излучения варьирует по данным различных авторов от 0,1 до 150 мВт/см^2, а диапазон энергетических доз колеблется в пределах от 0,01 до 5 Дж/см^2. Превышение оптимальных доз лазерного воздействия ведет к дисфункциональным, а порой и к деструктивным изменениям в организме.

Однако, несмотря на бесспорную эффективность, использование различных видов лазеров сопряжено с рядом трудностей и противопоказаний, как-то: воздействие лазерного излучения должно проводиться в специальных условиях, при которых необходимо исключить воздействие излучения на пациента и персонал за счет зеркального и диффузного отражения. Кроме того, необходимо точно определить и строго соблюдать установленную дозировку, следовательно, не-обходим высококвалифицированный персонал, имеющий разрешение на работу с лазерами. Также вследствие высокой биологической активности и малой изученности возможных побочных эффектов использование лазерного излучения имеет большое количество противопоказаний [3].

Все это привело к тому, что усилия ученых были направлены на создание более совершенных по безопасности приборов с сохранением их терапевтиче-ской эффективности. В исследованиях [4, 5], выполненных в 1981-1984 гг. в уни-верситете Земельвайс в Будапеште, было установлено, что биологической активностью и терапевтическим действием обладает не только лазерное излучение, но и полихроматический поляризованный свет теплового источника (галогенной лампы). Разработки венгерских ученых были воплощены в аппарате «Биоптрон», созданном в 1998 г. швейцарской фирмой «Bioptron AG». Сейчас этот аппарат зарегистрирован и разрешен для практического

применения на территории Республики Беларусь.

Особые свойства поляризованного полихроматического света, по данным Л.С. Касперович, Л.Е. Козловской и B.J. Behrens, S.L. Michlovitz и др., достигаются вследствие того, что аппарат «Биоптрон» является источником полихроматического (широкополосного) света с длиной волны от 400 до 2000 нм, то есть испускает излучение видимого и ближнего инфракрасного диапазона спектра без ультрафиолетовой компоненты. Источником излучения служит галогеновая лампа мощностью 20 – 60 Вт (в зависимости от модели). Важной особенностью света на выходе аппарата «Биоптрон» является его высокая (до 95%) степень поляризации. В основу метода получения линейно поляризованного света положено явление его частичной поляризации при однократном отражении (или прохождении) от плоскопараллельной пластинки, установленной под определенным углом (углом Брюстера). Высокое значение степени поляризации света, достигаемое в аппарате «Биоптрон», обеспечивается за счет многократного отражения света на многослойном зеркале оригинальной конструкции (поляризаторе Брюстера).

По степени поляризации света лампа «Биоптрон» приближается к лазерам, но в отличие от монохроматического когерентного излучения лазеров, в аппарате «Биоптрон» свет является полихроматическим (широкополосным), то есть некогерентным. При этом под когерентностью световой волны понимается согласованное протекание во времени и пространстве волновых процессов. Временная когерентность определяет степень монохроматичности излучения: чем выше временная когерентность, тем уже ширина спектра излучения источника. В этой связи ширина спектра излучения лампы «Биоптрон» (Dl = 2000 нм - 400 нм = 1600 нм) значительно превышает аналогичную величину полупроводниковых (Dl = 2 нм) или газовых (Dl = 0,02 нм) лазеров, применяемых в терапевтических аппаратах. Однако исследования венгерских ученых [4, 5] показали, что определяющую роль в реализации биологического и терапевтического действия света играет не степень его когерентности, а степень поляризации, которая для аппарата «Биоптрон» (95 %) близка к соответствующему значению полупроводниковых (95-98 %) и гелий-неоновых (100 %) лазеров терапевтических аппаратов.

Вышесказанное свидетельствует, что с помощью поляризованного света аппарата «Биоптрон» обеспечивается возможность оказывать мягкое регуляторное воздействие на организм, стимулировать его иммунную систему и ускорять обменные процессы с эффективностью, не уступающей НИЛИ. При этом многочисленные ограничения и высокие требования к эксплуатации и специальной под-готовке обслуживающего персонала существенно ограничивают возможность использования лазерной аппаратуры. Поэтому целесообразность исследования действия полихроматического поляризованного света не вызывает сомнений.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для изучения механизма иммуностимулирующего действия полихроматического поляризованного света исследования проводили на базе ЗАО «Липовцы» Витебского района. Из телят 2-3 месячного возраста были сформированы 3 группы по 5 голов каждая. Телят 1-й группы вакцинировали живой вакциной против инфекционного ринотрахеита крупного рогатого скота двукратно с интервалом в 28 дней и облучали поляризованным полихроматическим светом в области щитовидной железы в течение 10 дней по 8 минут 1 раз в день. При облучении лампа находилась на расстоянии 10-11 см от животного; плотность мощности светового воздействия составляла 40 мВт/см^2; разовая энергетическая доза 19,2 Дж/см^2. Телят 2-й группы вакцинировали живой вакциной против инфекционного ринотрахеита крупного рогатого скота двукратно с интервалом в 28 дней без облучения.

Во время опыта проводили отбор крови от всех телят до иммунизации, через 7, 21, 28 и 35 дней после иммунизации, получали сыворотку, которую в дальнейшем исследовали на наличие антител в ИФА и наличие вируса в ПЦР.

ИФА проводили с помощью набора BIOX. В результате получили значения оптических плотностей каждой пробы, которые пропорциональны количеству антител в сыворотке крови.

Для изучения воздействия поляризованного света на репродукцию вируса ИРТ были использованы: сформированный монослой перевиваемой культуры клеток МДБК на матрасе объемом 0,5 л, вирус инфекционного ринотрахеита (КМИЭВ-6), лампа «Биоптрон». При облучении монослоя клеток плотность мощности светового воздействия составляла 40 мВт/см^2.

Исследования проведены в 3 этапа. В первой серии опытов монослой облучали поляризованным полихроматическим светом по 2, 4 и 6 минут (энергетическая доза составляла соответственно 4,8, 9,6 14,4 Дж/см^2), после че-

го проводили заражение клеток. Во второй серии опытов облучение монослоя культуры клеток проводили поляризованным полихроматическим светом через 2 часа после заражения вирусом по 2, 4 и 6 минуты. В третьей серии опытов вначале монослой облучали поляризованным полихроматическим светом по 2, 4 и 6 минуты, производили заражение клеток вирусом, и через два часа снова проводили облучение. Контроль – зараженный монослой клеток вирусом без облучения.

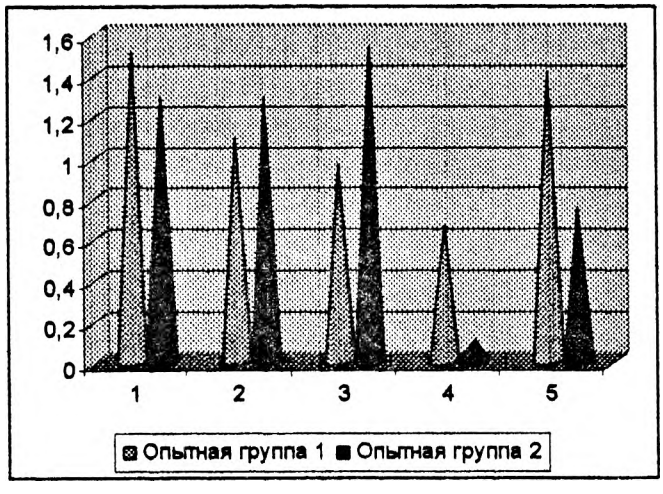
Для определения наличия вируса и его количества в пробах сыворотки крови и культуральной жидкости использовали количественную полимеразную цепную реакцию в режиме реального времени, чувствительность которой составляет 10 копий/мкл.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

В таблице 1 и на рис. 1 представлены результаты постановки ИФА у телят наличие антител.

Таблица 1 — Наличие антител у телят после вакцинации против инфекционного ринотрахеита после облучения полихроматическим поляризованным светом

Группы телят	Значение оптической плотности при λ=450 нм				
	до вакцинации	7 день	21 день	28 день	35 день
Опытная № 1 (облученные)	1,51± 0,33	1,09± 0,89	0,96± 0,64	0,66±0 ,72	1,41± 0,72
Опытная № 2 (необлученные)	1,29± 0,98	1,29± 1,01	1,53± 1,19	0,11±0 ,06	0,75± 0,37



1 – 1 день, 2 – 7 день, 3- 21 день, 4 – 28 день, 5 – 35 день

Рисунок 1 — Выявление антител у телят после вакцинации против инфекционного ринотрахеита

Таким образом, из представленных данных видно, что облучение поляризованным полихроматическим светом способствует более высокому биосинтезу противовирусных антител при вакцинации животных, особенно после ревакцинации.

Особенностью иммунного ответа при использовании живых вакцин является повышение репродукции вируса в чувствительных клетках. Поэтому нами проведены исследования по определению в сыворотке крови вакцинированных телят вируса ИРТ с использованием ПЦР.

Результаты наличия вируса ИРТ в сыворотке крови от телят после вакцинации против инфекционного ринотрахеита и облученных поляризованным полихроматическим светом представлены в таблице 2 и на рисунке 2.

Таблица 2 — Результаты обнаружения ДНК вируса ИРТ у телят после вакцинации против инфекционного ринотрахеита и облученных поляризованным полихроматическим светом

Группы	Количество копий ДНК в 250 мкл сыворотки крови телят по дням взятия крови			
	7 день	21день	28 день	35 день
ОГ 1 (облученные)	**56,72±** 15,44 3	**78,97±** 39,79	**68,80±** 36,23	**75,66±** 50,48
ОГ 2 (необлученные)	**90,32±** 24,75	**106,96±** 53,79	**42,10±** 26,19	**8,43±** 11,89

1 – 7 день, 2 – 21 день, 3- 28 день, 4 – 35 день

Рисунок 2 — Результаты обнаружения ДНК вируса ИРТ у телят после вакцинации против инфекционного ринотрахеита и облученных поляризованным полихроматическим светом

Полученные результаты свидетельствуют, что облучение приводит к угнетению репродукции вируса в чувствительных клетках органов дыхания после первичного введения вакцины. Усиление репродукции вируса отмечается после второй иммунизации.

Анализ результатов, полученных при изучении биосинтеза антител и репродукции вируса, свидетельствует, что при первичном введении вакцины у облученных поляризованным полихроматическим светом телят отмечается угнетение репродукции вируса и в то же время пониженный уровень биосинтеза антител, хотя у телят, которые получали вакцину без облучения отмечен более активный биосинтез антител и повышенная репродукция вируса. Но после вторичной вакцинации у облученных телят к 28 дню в 1,5 раза, а к 35 дню в 9 раз повышается репродукция вируса и одновременно - в 2 раза повышается уровень противовирусных антител. Полученные данные свидетельствуют о том, что в поствакцинальном иммунном ответе биосинтез противовирусных антител напрямую зависит от репродукции вируса в чувствительных клетках. Облучение телят поляризованным полихроматическим светом приводит к угнетению репродукции вируса на ранних стадиях иммуногенеза, но в последующем - к стимуляции его репродукции и способствует более активному биосинтезу противовирусных антител.

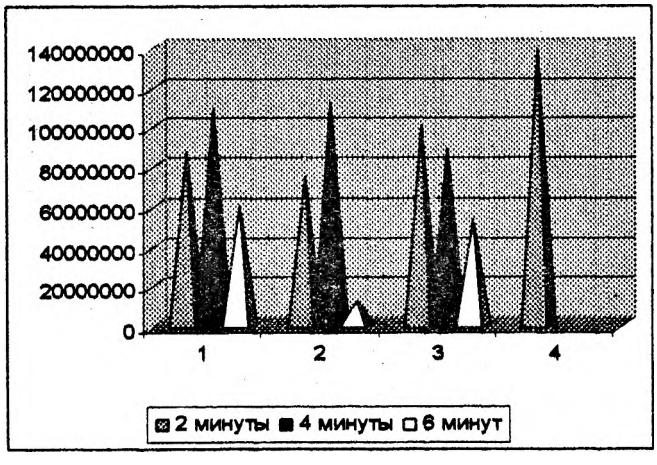
Для подтверждения угнетающего действия поляризованного полихроматического света на репродукцию вируса инфекционного ринотрахеита в системе in vitro провели соответствующий цикл исследований.

При этом установлено, что через 48 часов после заражения во всех матрасах отмечено характерное для вируса ИРТ ЦПД. После замораживая клеток в каждом образце провели обнаружение вируса с использованием количественной полимеразной цепной реакции в режиме реального времени, чувствительность которой составляет 10 копий/мкл.

В таблице 3 и на рисунке 3 приведены результаты выявления наличия ДНК вируса ИРТ после культивирования с различными сроками облучения поляризованным полихроматическим светом монослоя культуры клеток.

Таблица 3 — Результаты выявления наличия ДНК вируса ИРТ после культивирования с различными сроками облучения поляризованным полихроматическим светом монослоя культуры клеток

Время облучения и энергетическая доза	До заражения		После заражения		До и после заражения	
	количество копий ДНК	угнетение репродукции, раз	количество копий ДНК	угнетение репродукции, раз	количество копий ДНК	угнетение репродукции, раз
2 мин (4,8 Дж/см^2)	$8,74 \times 10^7$	1,58	$1,09 \times 10^8$	1,27	$5,95 \times 10^7$	2,32
4 мин (9,6 Дж/см^2)	$7,44 \times 10^7$	1,85	$1,12 \times 10^8$	1,23	$1,17 \times 10^7$	11,79
6 мин (14,4 Дж/см^2)	$1,01 \times 10^8$	1,37	$8,87 \times 10^7$	1,56	$5,27 \times 10^7$	2,61
Контроль (без облучения)	$1,38 \times 10^8$					



1 – облучение до заражения; 2- облучение через 2 часа после заражения, 3 – облучение до заражения и через 2 часа после заражения; 4 – контроль без облучения

Рисунок 3 — Результаты выявления наличия ДНК вируса ИРТ после культивирования с различными сроками облучения поляризованным полихроматическим светом монослоя культуры клеток

Полученные результаты свидетельствуют, что облучение монослоя культуры клеток поляризованным полихроматическим светом приводит к угнетению репродукции вируса инфекционного ринотрахеита. Характерно, что предварительное облучение уменьшает количество вируса в 1,38-1,85 раз, облучение после заражения – 1,27-1,56 раза. Но когда проводят облучение до и после заражения, количество вируса уменьшается в 2,32 – 11,79 раза по сравнению с контролем. Это свидетельствует, что поляризованный полихроматический свет активизирует метаболизм клеток, препятствует проникновению вируса в клетку и тем самым происходит угнетение его репродукции.

Эти данные в некоторой степени объясняют воздействие поляризованного полихроматического света на репродукцию вируса инфекционного ринотрахеита в системе in vivo.

При облучении происходит активизация чувствительных клеток, приводящая к понижению проникновения вируса в чувствительные клетки.

ЛИТЕРАТУРА

1.Козловская, Л.Е. Фототерапия полихроматическим поляризованным светом (биоптронотерапия)/ Л.Е. Козловская, В.С. Улащик// Здравоохранение, 1999. - №8. – С. 53 – 54.

2.Улащик, В.С. Поляризованный свет: получение, особенности бействия и клиническое проявление/ В.С. Улащик, Д.Н. Чичкан// Здравоохранение, 1999. - №6. – С. 33 – 36.

3.Behrens, B.J. Physical Agents: Theory and practice/ B.J. Behrens, S.L. Michlovitz. – Philadelphia, 1998. – 23 S.

4. Kertesz I., Fenyö M., Mester E., Bathori G. Hypothetical physical model for laser biostimulation. – Opt. Laser Technol. 1982, v. 14, no. 1, p. 31-32.

5. Fenyö M. Theoretical and experimental basis of biostimulation by laser irradiation. – Opt. Laser Technol. 1984 v. 16, no. 4, p. 209-215.