

УДК 636:612.112.3/619:615.37

Мартынова М.А., кандидат химических наук ¹
Бушмакина И.М., кандидат биологических наук ¹
Карпович А.И., лаборант¹
Красочко П.А., доктор ветеринарных наук, доктор биологических наук, профессор ²
Борисовец Д.С., кандидат ветеринарных наук ²
Шуканова Н.А., кандидат биологических наук ¹

¹ГНУ «Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси», Минск

²РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышеслесского», Минск

ФАГОЦИТАРНАЯ АКТИВНОСТЬ НЕЙТРОФИЛЬНЫХ ГРАНУЛОЦИТОВ В ПРИСУТСТВИИ ИММУНОСТИМУЛЯТОРОВ

Резюме

В экспериментах *in vitro* изучена фагоцитарная активность свежесыведенных нейтрофильных гранулоцитов и их первичной культуры при взаимодействии с различными иммуностимуляторами. Установлено, что коммерческий препарат «Альвеозан» существенно стимулирует функциональную активность фагоцитов, однако по своему действию он значительно уступает иммуностимулятору, созданному на основе липополисахаридов из штамма № 22 бактерий *Bacillus subtilis*, причем эффект развивается в течение 60 минут.

Summary

The effect of the different bacterial immunostimulators on phagocyte activity of isolated granulocyte and primary culture of this cells *in vitro* was studied. Commercial drug Alveozan essentially stimulated of phagocyte activity, but considerable yield to the immunostimulator from *Bacillus subtilis*, it being known that this effect developed during 60 minutes.

Поступила в редакцию 18.01.2016 г.

ВВЕДЕНИЕ

Важное значение в поддержании здоровья и продуктивности животных наряду с сердечно-сосудистой, эндокринной, нервной и другими системами имеет и иммунная система организма. Расстройство функции иммунокомпетентных органов приводит к нарушениям гомеостаза, специфическим болезням, снижает общую сопротивляемость организма к различным патогенам и сопровождается рядом неспецифических проявлений, таких как задержка роста и развития молодняка, снижение продуктивности и воспроизводительной функции взрослых животных, ослабление репаративных процессов при повреждении.

В ветеринарной практике чаще встречаются заболевания, обусловленные иммунодефицитными состояниями, но иног-

да отмечают и болезни, связанные с повышением активности иммунной системы – аутоиммунные заболевания, такие как системная красная волчанка, полиартриты, ревматоидный артрит и др. В любом из этих случаев необходима фармакокоррекция животного организма. Для этой цели разработано множество препаратов, которые могут оказывать либо общее (или неспецифическое) действие на естественную резистентность организма, либо влиять на отдельные звенья иммунитета – на гуморальный (интерферон, гамма-глобулины и т.п.), клеточный (лимфоциты, макрофаги) и их взаимодействия между собой и другими системами организма (цитокины).

Лекарственные соединения, повышающие иммунореактивность и резистентность организма, относят к иммуностиму-

ляторам, средства, подавляющие такие реакции, относят к иммунодепрессантам и, наконец, субстанции, нормализующие резистентность и иммунореактивность животных, относят к иммуномодуляторам.

Иммуностимуляторы используются для повышения адаптивных возможностей организма при экстремальных ситуациях, для формирования невосприимчивости животных к заболеваниям в очагах патологий, для восстановления сниженного иммунитета.

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. Однако 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 установленной вакцинации.

Следует отметить, 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.

На сегодняшний день в ветеринарной практике используется широкий спектр различных иммуностимуляторов, однако продолжает оставаться актуальной разработка и внедрение в практику ветеринарии новых отечественных высокоэффективных иммуностимулирующих препаратов для лечения и профилактики вирусных и паразитарных болезней.

В РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского»

создан новый иммуностимулятор бактериального происхождения для ветеринарии на основе липополисахаридов штамма № 22 бактерий *Bacillus subtilis*. Данный препарат относится к биологическим иммуностимуляторам, а точнее к группе препаратов из микроорганизмов согласно классификации [1]. Иммуностимуляторы оказывают на иммунную систему организма животных значительное влияние, причем воздействуют как на гуморальные факторы иммунитета, так и на клеточное звено, повышают активность иммунокомпетентных клеток, создают устойчивость организма к воздействию инфекционных агентов. Развивающиеся тенденции в создании новых эффективных иммуномодуляторов на основе современных технологий позволяют надеяться на решение проблемы иммунокоррекции [3].

Целью настоящей работы являлось проведение сравнительного анализа действия нового иммуностимулятора бактериального происхождения и коммерческого препарата «Альвеозан» на функциональное состояние фагоцитов периферической крови животных в условиях *in vitro*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали новый иммуностимулятор бактериального происхождения из штамма № 22 бактерий *Bac. subtilis* и коммерческий препарат «Альвеозан».

Исследования проводили на фагоцитах периферической крови морских свинок. Нейтрофильные гранулоциты (НГ) выделяли стандартным способом центрифугирования в градиенте плотности фиколлюрографина. Суспензию клеток высеивали на чашки Петри в конечной концентрации $3,5 \times 10^5$ фагоцитов на чашку (камера Горяева), добавляли 3 мл среды DME, 30 мкг 0,1% гентамицина, 300 мкл сыворотки и культивировали 2 часа при температуре 37°C в суховоздушном CO₂-инкубаторе HERAcell 150. Жизнеспособность НГ составляла 98 %. Поскольку НГ являются классическими фагоцитами – имеют адге-

живность, подвижность, способность к хемотаксису, а также способность захватывать частицы – они адгезируют к поверхности чашки Петри, количество таких клеток достигает 97 %. Жидкую фазу аккуратно отсасывали, к НГ добавляли 3 мл свежей среды DME (без антибиотика), 50 мкл индифферентных частиц туши (1/200) и 250 мкл исследуемых иммуностимуляторов с последующим культивированием при температуре 37°C в суховоздушном CO₂-инкубаторе HERAcell 150 в течение 60 мин и 24 часов. В качестве контроля выступали НГ, инкубированные в течение исследуемого времени в среде DME (без антибиотика) с добавлением чужеродных частиц туши. Жизнеспособность контрольных образцов составляла: через 60 мин. инкубации – 98 %, после 24 ч инкубации – 95 %.

После инкубации чашку Петри промывали, клетки фиксировали метанолом, окрашивали по Романовскому-Гимза и микроскопировали с применением иммерсионного объектива [2].

Фагоцитарную активность нейтрофильных гранулоцитов периферической крови оценивали по способности поглощать индифферентные частицы туши. В качестве показателей, характеризующих поглотительную способность фагоцитов, определяли фагоцитарный показатель – процент фагоцитирующих клеток от общего числа фагоцитов и фагоцитарное число – среднее количество частиц туши, поглощенных одним активным фагоцитом (отн.ед.) [2].

С целью получения статистически достоверных значений измеряемых величин опыты проводили не менее 5 раз. Для статистической обработки экспериментальных данных использовали пакеты программ «Microsoft Excel 2010», «Origin 7.5». Результаты опытов обрабатывали статистически с вычислением средней арифметической, стандартным отклонением и достоверности различий (p) по критерию Стьюдента-Фишера.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Фагоцитоз в настоящее время считают одним из основных критериев оценки состояния иммунного статуса, являющегося фундаментальной составляющей иммунной защиты организма. Это обусловлено тем, что филогенетически фагоцитоз является наиболее древним защитным приспособлением, на основе которого эволюционно сформировалась вся система иммунной защиты. Клетки, осуществляющие фагоцитоз (нейтрофилы, моноциты, макрофаги), называют общим термином – фагоциты. Основным звеном фагоцитарной системы организма являются нейтрофилы крови, и оценка их функциональной активности считается ценным диагностическим критерием.

Для изучения влияния иммуностимуляторов на фагоцитарную активность НГ использовали свежeweделенные нейтрофилы и первичную культуру этих клеток. Соответственно оценивали влияние иммуностимуляторов на свежeweделенные НГ (60 мин инкубации с исследуемыми препаратами), одновременно проводили длительную инкубацию с первичной культурой нейтрофильных гранулоцитов (24 часа совместного культивирования). С этой целью к клеткам, выделенным от одного и того же животного, добавляли либо новый иммуностимулятор бактериального происхождения, либо коммерческий препарат «Альвеозан» в концентрации 250 мкл на 3 мл среды с последующей инкубацией НГ в течение исследуемого времени. Параллельно инкубировались контрольные образцы клеток без добавления иммуностимуляторов. Необходимость одновременного исследования двух клеточных вариантов была продиктована тем, что эффекты, которые вызывают иммуностимуляторы в клетках, могут быть пролонгированы во времени.

Установлено, что у контрольных свежeweделенных нейтрофильных гранулоцитов крови, инкубированных в течение 60 мин в среде без иммуностимуляторов

(жизнеспособность клеток составляет 98 %), фагоцитарный показатель составляет $10,6 \pm 1,6$ %, то есть только 10 нейтрофилов из 100 способны к фагоцитозу. Кроме того, в контрольных клетках максимальное число захвата чужеродных частиц одним активным фагоцитом составляет 15 индифферентных частиц туши.

Внесение в среду инкубации клеток иммуномодуляторов существенно стимулируют фагоцитарную активность НГ.

Так, липополисахариды штамма №22

Bac. subtilis после 60-минутной инкубации с клетками существенно (более чем в 7 раз) повышают количество активных НГ, способных к фагоцитозу, $p < 0,01$ – по сравнению с контролем, где иммуностимуляторы отсутствуют (таблица 1). Причем следует отметить, что при использовании данного иммуностимулятора и фагоцитарное число существенно возрастает и достигает 85 ± 6 частиц туши на 1 активный фагоцит при $p < 0,05$ по сравнению с контролем (таблица 2).

Таблица 1 – Зависимость фагоцитарного показателя свежевыделенных нейтрофильных гранулоцитов (60 мин инкубации) и их первичной культуры (24 ч инкубации) от присутствия иммуностимуляторов в среде инкубации клеток

Исследуемые образцы	Фагоцитарный показатель, %	
	60 мин	24 ч
контроль (НГ)	$10,6 \pm 1,6$ n = 21	$11,1 \pm 2,1$ n = 20
НГ + новый иммуностимулятор на основе липополисахаридов штамма № 22 <i>Bac. subtilis</i>	$77,2^{**} \pm 7,3$ n = 17	$77,9^{**} \pm 7,0$ n = 19
НГ + препарат «Альвеозан»	$55,7^* \pm 4,9$ n = 20	$53,2^{**} \pm 4,4$ n = 18

Примечание – Различия статистически значимы по сравнению с контролем: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$

Таблица 2 – Зависимость фагоцитарного числа свежевыделенных нейтрофильных гранулоцитов (60 мин инкубации) и их первичной культуры (24 ч инкубации) от присутствия иммуностимуляторов в среде инкубации клеток

Исследуемые образцы	Фагоцитарное число, отн.ед.	
	60 мин	24 ч
Контроль (НГ)	15 ± 2 n = 17	16 ± 2 n = 20
НГ + новый иммуностимулятор на основе липополисахаридов штамма № 22 <i>Bac. subtilis</i>	$85^* \pm 6$ n = 14	$93^{**} \pm 2$ n = 15
НГ + препарат «Альвеозан»	$52^{**} \pm 2$ n = 14	$55^{**} \pm 3$ n = 18

Примечание – Различия статистически значимы по сравнению с контролем: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$

Аналогичная стимуляция функциональной активности НГ наблюдается и при использовании коммерческого препарата «Альвеозан», но абсолютный уровень ее был несколько ниже, чем в случае применения нового иммуностимулятора бактериального происхождения. В данном случае фагоцитарный показатель возрастает в 5 раз ($p < 0,05$) по сравнению с контролем, а фагоцитарное число составляет 52 ± 2 чужеродных частиц при $p < 0,01$.

Во второй серии экспериментов была проведена длительная инкубация исследуемых иммуностимуляторов с первичной культурой нейтрофильных гранулоцитов (24 часа совместного культивирования). В контрольных образцах первичной культуры клеток (без иммуностимуляторов) фагоцитарный показатель составил $11,1 \pm 2,1$ % при $n = 20$, а фагоцитарное число составило 16 ± 2 при $n = 20$. Жизнеспособность нейтрофильных гранулоцитов в контроле – 95 %.

Установлено, что по сравнению с НГ после 60 минутной инкубации с исследуемыми веществами фагоцитарное число возрастает лишь незначительно: на $8,8 \pm 0,5$ % при $p < 0,01$ (для иммуностимулято-

ра бактериального происхождения) и на $4,4 \pm 0,1$ $p < 0,01$ % (для коммерческого препарата). При этом фагоцитарный показатель достоверно не изменялся (таблица 1, 2).

Таким образом, можно заключить, что эффект повышения фагоцитарной активности клеток под влиянием исследуемых иммуностимуляторов развивается достаточно быстро (в течение 60 мин совместного культивирования), причем в дальнейшем он сохраняется и не претерпевает существенных изменений.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Как известный коммерческий препарат «Альвеозан», так и созданный в РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского» новый иммуностимулятор на основе липополисахаридов штамма № 22 *Bac. subtilis* повышают функциональную активность фагоцитов периферической крови лабораторных животных по параметрам фагоцитарный показатель и фагоцитарное число, причем новый бактериальный препарат проявляет более высокую эффективность.

ЛИТЕРАТУРА

- 1 Красочко, П.А. Иммунокоррекция в клинической ветеринарной медицине / П. А. Красочко [и др.]; под редакцией П. А. Красочко. – Мн.: Техноперспектива. – 2008. – 507 с.
- 2 Щемелева, Н.Ю. Иммуностимуляторы: перспективы и эффективность применения / Н.Ю. Щемелева, М.В. Якубовский // Наше сельское хозяйство. – 2010. – № 2. – С. 22 – 34.
- 3 Лобанова, Е.М. Фагоцитарная активность стимулированных альвеолярных макрофагов в условиях гипоксии и гипертермии / Е.М. Лобанова, А.Д. Таганович // Белорусский медицинский журнал. – 2005. – Т. 11. – № 1. – С. 66 – 68.

Корм для пчел «Апифуд»



- ◆ предназначен для восполнения недостатка естественных кормов в пчелиных семьях в зимний период до поступления свежей пыльцы и нектара из природных источников;
- ◆ не вызывает возбуждения пчел, исключает их вылет и гибель в условиях низких весенних температур;
- ◆ потребление корма происходит непосредственно при поедании его пчелами и практически не используется для складирования в соты – этим исключается попадание корма в товарный мед;
- ◆ используется в зимний и ранне-весенний периоды;
- ◆ срок годности 12 месяцев при температуре хранения от плюс 4°C до плюс 25°C.