

клетки шаровидной формы. На 5-е сутки клеточный монослой составлял 100% и количество клеток в культуре достигло насыщения (конечная плотность клеток). Клетки имели биполярную форму и были менее распластаны с образованием характерных решеток и завитков, при этом скорость роста культуры клеток ВНК-21 clone 13 замедлилась. Культивируемые клетки полностью покрывали поверхность культурального флакона (рисунок 4).

Для оценки стабильности клеточного субстрата при его культивировании нами было проведено 10 последовательных пассажей, в результате которых установили, что клетки имели жизнеспособность 95-98% и кратность прироста 1:38, что обеспечивало постоянство производства требуемого продукта.

**Заключение.** В процессе выращивания восстановленной после криоконсервации клеточной линии ВНК-21 cl-13 на роллерах было установлено, что клетки имели типичную морфологию и сохраняли стабильность биологических свойств в течение всего срока культивирования.

Установлено, что производственная клеточная линия ВНК-21 clone 13 быстро восстанавливается после криоконсервирования с посевной концентрацией клеток  $3,5 \times 10^6$  и имеет кратность прироста 1:38, а жизнеспособность клеток составляет 95-98% при роллерном культивировании. Это позволяет использовать клеточную линию ВНК-21 clone 13 для накопления вирусной массы с целью получения ветеринарных иммунобиологических препаратов.

#### **Литература.**

1. Блажевич, О.В. *Культивирование клеток Курс лекций / О.В. Блажевич – Мн.: БГУ. – 2004. – 78 с.*
2. Горохова, Н.А. *Кріоконсервування культивованих фібробластоподібних клітин шляхом повільного заморожування і вітрифікації: автореф. дис. канд. біол. наук. 03.00.19/ Н.А. Горохова, ИПКиК НАНУ. – 2005. – 26 с.*
3. Фрешни, Р.Я. *Культура животных клеток: практическое руководство / Р.Я. Фрешн. – пер. 5-го англ. изд. – М.: БИНОМ. Лаборатория знаний. – 2014. – 691с.*
4. Фуллер, Б. *Криоконсервирование для создания банка клеток: современные концепции на рубеже XXI столетия / Б. Фуллер, К. Грин, В.И. Грищенко. // Проблемы криобиологии. – 2003. – № 2. – С. 62–83.*

## **БАКТЕРИАЛЬНЫЕ ЛИПОПОЛИСАХАРИДЫ - ПОЛИКЛОНАЛЬНЫЕ АКТИВАТОРЫ КЛЕТОЧНОГО И ГУМОРАЛЬНОГО ИММУНИТЕТА**

<sup>1</sup>КРАСОЧКО И.А., <sup>1</sup>ЧАЙКОВСКИЙ Н.А., <sup>2</sup>ПОПОВА П.Ю., <sup>1</sup>ОВЧИННИКОВА В.В., <sup>2</sup>БЫЧКОВА Т.К.,  
<sup>1</sup>ВОЛОСЮК Е.И.

<sup>1</sup>УО «Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины»,  
г. Витебск, Республика Беларусь

<sup>2</sup>ФГБОУ ВО «Смоленская государственная сельскохозяйственная академия»,  
г. Смоленск, Российская Федерация

*Приведены результаты анализа литературных данных по источникам, получению, механизму действия на иммунитет и применению бактериальных липополисахаридов. Показано, что полные молекулы ЛПС (т.н. S-форма) состоят из трех компонентов, различающихся по структуре и биологическим функциям: липидной части (липида А), полисахаридной цепи (О-специфическая цепь, О-полисахарид) и расположенного между ними олигосахарида – кора (лат. core – ядро). Липополисахариды стимулируют многие защитные реакции организма: увеличивают количество лейкоцитов и их фагоцитарную активность, повышают активность системы комплемента, резистентность клеточных и субклеточных мембран к действию повреждающих агентов. Под влиянием ЛПС макрофаги, полиморфно-ядерные нейтрофилы и другие клетки продуцируют интерлейкины (ИЛ-1, ИЛ-6), простагландины, оксид азота (NO), кислородные радикалы и др.*

**Ключевые слова:** бактериальные липополисахариды, иммунитет, стимуляция, резистентность, поствакцинальный иммунитет.

## **BACTERIAL LIPOPOLYSACCHARIDES ARE POLYCLONAL ACTIVATORS OF CELLULAR AND HUMORAL IMMUNITY**

<sup>1</sup>KRASOCHKO I.A., <sup>1</sup>TCHAIKOVSKY N.A., <sup>2</sup>POPOVA P.YU., <sup>1</sup>OVCHINNIKOVA V.V.,  
<sup>2</sup>BYCHKOVA T.K., <sup>1</sup>VOLOSUYUK E.I.

<sup>1</sup> UE "Vitebsk Order "Badge of Honor" State Academy of Veterinary Medicine",  
Vitebsk, Republic of Belarus

<sup>2</sup> FGBOU VO "Smolensk State Agricultural Academy", Smolensk, Russian Federation

*The results of the analysis of literature data on sources, production, mechanism of action on immunity and the use of bacterial lipopolysaccharides are presented. It is shown that complete LPS molecules (the so-called S-form) consist of three components that differ in structure and biological functions: the lipid part (lipid A), the polysaccharide chain (O-specific chain, O-polysaccharide) and the oligosaccharide located between them – the bark (Latin core – core). Lipopolysaccharides stimulate many protective reactions of the body: they increase the number of leukocytes and their phagocytic activity, increase the activity of the complement system, resistance of cellular and subcellular membranes to the action of damaging agents. Under the influence of LPS, macrophages, polymorphonuclear neutrophils and other cells produce interleukins (IL-1, IL-6), prostaglandins, nitric oxide (NO), oxygen radicals, etc.*

**Keywords:** bacterial lipopolysaccharides, immunity, stimulation, resistance, post-vaccination immunity.

В настоящее время в животноводческих хозяйствах большое значение в проявлении инфекционного процесса массовых инфекционных заболеваний сельскохозяйственных животных играет иммунодефицитное состояние животных. В связи с этим много внимания уделяется изучению иммунодефицита, при котором животные попадают в группу повышенного риска заболевания.

Причины иммунодефицита весьма разнообразны: они включают факторы внутриутробного развития, зависящие от материнского организма и воздействия различных иммунодепрессантов. Наряду с нарушением условий содержания и кормления животных, последствиями воздействия гербицидов, нитратов и нитритов, иммунодефицит возникает при нерациональном применении антибиотиков, некоторых противопаразитарных препаратов и др. К биологическим иммунодепрессантам относятся возбудители инфекционных болезней.

В связи с этим большого внимания заслуживают разработки иммуномодуляторов, действие которых направлено на повышение резистентности организма животных и специфическую иммуностимуляцию. В мире уже накоплен достаточный опыт по использованию иммуномодуляторов при различных патологиях и для усиления иммунного ответа организма животного при вакцинациях.

В последние годы возрос интерес исследователей к липополисахаридам (ЛПС) клеточной стенки грамотрицательных бактерий. ЛПС выполняют две основные функции: определяют антигенную специфичность и являются главным фактором патогенности - это компонент эндотоксина. Число сообщений об изучении различных липополисахаридов трудно обозримо уже сейчас и продолжает стремительно нарастать. Особенно интенсивно изучаются липополисахариды грамотрицательных бактерий, в оболочке которых содержится до 15 – 40% ЛПС. Полисахаридные препараты вызывают наибольший интерес среди средств неспецифической стимулирующей терапии.

ЛПС является основным поверхностным антигеном бактерий и против него направлен иммунный ответ инфицированных животных и человека. Именно строение ЛПС определяет результат иммунного ответа – будет ли бактериальная клетка распознана и уничтожена защитной системой организма-хозяина или же фагоцитоз будет предотвращен и будет обеспечено выживание бактерии.

Полные молекулы ЛПС (т.н. S-форма) состоят из трех компонентов, различающихся по структуре и биологическим функциям: липидной части (липид А), полисахаридной цепи (О-специфическая цепь, О-полисахарид) и расположенного между ними олигосахарида – кора (лат. core – ядро).

Участок липида А является наиболее константным участком молекулы ЛПС, и его строение схоже у многих бактерий. Липид А ответственен за биологическую активность ЛПС, включая способность индуцировать образование противовоспалительных цитокинов и вызывать септический шок.

Липополисахариды стимулируют многие защитные реакции организма: увеличивают количество лейкоцитов и их фагоцитарную активность, повышают активность системы комплемента, резистентность клеточных и субклеточных мембран к действию повреждающих агентов. Под влиянием ЛПС макрофаги, полиморфно-ядерные нейтрофилы и другие клетки продуцируют интерлейкины (ИЛ-1, ИЛ-6), простагландины, оксид азота (NO), кислородные радикалы и др.

ЛПС активируют в клетках эндотелия сосудов конститутивную NO-синтазу, а в моноцитарно-макрофагальной системе, гепатоцитах, клетках кишечного эндотелия — индуцибельную NO-синтазу, под действием которых аминокислота L-аргинин освобождает NO и превращается в цитрулин. NO может оказывать ряд физиологических и защитных эффектов. Так, например, NO, проникая из эндотелия сосудов в мышечную оболочку, активирует цГМФ и в конечном итоге снижает тонус сосудов.

Поликлональный активирующий эффект липополисахаридов может быть реализован без участия макрофагов и Т-лимфоцитов, хотя Т-клетки с регулирующей поликлональный ответ функцией, возможно, могут вовлекаться в процесс за счет прямого воздействия на них липополисахаридов.

Включение мембрано-молекулярного механизма активации лимфоцитов происходит в результате взаимодействия липополисахаридов с рецепторами мембран. Важнейшим следствием взаимодействия липополисахаридов и рецептора является изменение внутриклеточного уровня циклических нуклеотидов. Изменение уровня циклических нуклеотидов, по-видимому, происходит вторично как следствие изменения концентрации ионов кальция. Не исключено, что липополисахариды являются активным разобщителем окислительного фосфорилирования.

Согласно данным большинства исследователей, адьювантная и митогенная активность липополисахаридов в значительной степени обусловлена липидом А.

Мощной митогенной способностью обладает эндотоксиновый протеин, выделенный из наружной мембраны грамотрицательных бактерий. Однако полисахариды, полученные мягким кислотным гидролизом липополисахаридов, без видимой примеси белка и липида сохраняют выраженную адьювантную активность. С липидным компонентом липополисахаридов О. Luderitz связывает токсичность и пирогенность ЛПС, а Е. С. Станиславский - выявляемую в некоторых условиях их иммуносупрессивную активность.

Важная роль в реализации биологических эффектов ЛПС принадлежит фактору некроза опухоли-альфа (ФНО- $\alpha$ ), интерлейкинам и другим медиаторам действия ЛПС, таким как фосфолипидный фактор активации тромбоцитов (ФАТ), лейкотриены, тромбоксан А<sub>2</sub> и простагландины. Цитокины обеспечивают оптимальный метаболический гомеостаз и являются необходимыми трансммиттерами межклеточного взаимодействия. Эндотоксин, ФНО- $\alpha$ , ФАТ, лейкотриены, тромбоксан А<sub>2</sub>, интерлейкины и другие биологически активные вещества, воздействуя на эндотелий, увеличивают его проницаемость, способствуют развитию стаза, повышают экспрессию адгезивных молекул на поверхности эндотелия для циркулирующих полиморфноядерных лейкоцитов, с чем может быть связано развитие маргинального лейкостаза и гранулоцитопении, как следствие истощения миелопоэза.

Благодаря способности ЛПС активировать фагоцитирующие клетки происходит выброс лизосомальных энзимов, усиление метаболизма арахидоновой кислоты, ускорение кислородного метаболизма, что, с одной стороны, может быть причиной повреждения близлежащих клеток (в частности, эндотелиальных), а с другой – интенсификации процессов фагоцитоза.

Хорошо известны адьювантные эффекты ЛПС. Он способен вызывать пролиферацию, дифференцировку и активацию Т- и В-лимфоцитов, в результате чего стимулируется как клеточное, так и гуморальное звено иммунного ответа на любые антигены. Возникающие как следствие эндотоксиновой агрессии гиперпродукция цитокинов и медиаторный хаос сменяются глубокой депрессией системы фиксированных макрофагов со всеми вытекающими отсюда последствиями (включая угнетение синтетической и секреторной функции клеток-мишеней).

Препараты ЛПС могут быть получены различными общими методами, разработанными первоначально для очистки ЛПС энтеробактерий - экстракцию трихлоруксусной кислотой, смесью петролейный эфир/хлороформ/фенол, кислотным или щелочным гидролизом.

К средствам неспецифической стимулирующей терапии из группы бактериальные липополисахариды относят такие препараты как продигиозан, пирогенал, сальмозан, сальмопул, витстимулин, альвеозан, иммуновит и др.

**Продигиозан.** Продигиозан выделен в 1961 году З.В. Ермольевой и Т.Е. Вайсберг из непатогенного штамма *Bacterium prodigiosum*. Это - высокомолекулярный комплекс, в состав которого входит 80% полисахаридов и до 20% липидов, в том числе и ЛПС, которые и обуславливают иммуностимулирующее действие.

Наиболее отчетливый эффект при введении продигиозана отмечается в макрофагах и нейтрофильных гранулоцитах, которые резко увеличивают фагоцитарную функцию, выраженность протеолитических ферментов, окислительно-восстановительные реакции. После введения продигиозана в крови увеличивается число нейтрофильных гранулоцитов и их поглотительная способность, причем максимум фагоцитарной активности лейкоцитов удерживается значительно дольше, чем лейкоцитов. Так, если число лейкоцитов возвращается к первоначальному через 1-2 суток после однократного введения продигиозана, то фагоцитарная активность остается повышенной еще и на 3 сутки.

Нежелательные эффекты: повышение температуры тела, при котором можно назначать антипиретики, поскольку иммуностимулирующий эффект продигиозана не зависит от гипертермии; местные реакции — болезненность и припухлость в зоне введения.

**Пирогенал.** Препарат получают из культуры *Pseudomonas aeruginosa* (пирогенал Р) или *Salmonella typhimurium* (пирогенал Т). В его состав входит липополисахаридная фракция культуры микроорганизмов.

Активность измеряется в минимальной пирогенной дозе (МПД) — количестве активного вещества, повышающего температуру тела кролика на 0,6° при внутривенном введении. МПД для кроликов составляет 0,001 мкг/кг, для проведения курсовой терапии у человека устанавливается разовая доза, вызывающая повышение температуры тела до 37,5-38,0°С.

Повышая температуру тела посредством действия на центральные механизмы терморегуляции, пирогенал в организме человека имитирует эффекты ИЛ1 и создает температурный оптимум для действия последнего.

При испытаниях на здоровых животных пирогенал вызывал кратковременную лейкопению, которая через несколько часов сменялась лейкоцитозом. Число лейкоцитов в периферической крови увеличивалось на 40-50% по сравнению с таковым при действии плацебо (изотонический раствор натрия хлорида) в основном за счет палочкоядерных и сегментоядерных нейтрофильных гранулоцитов, но спустя сутки -возвращалось к первоначальному уровню.

Пирогенал, действуя подобно интерлейкину-1, является индуктором эндогенного интерферона. Препарат противопоказан при беременности и острых лихорадочных состояниях, при подозрении на инфицированность вирусом гриппа, поскольку отмечено, что он снижает резистентность к вирусным инфекциям.

**Сальмозан** - представляет собой полисахаридный компонент О-соматического антигена сальмонелл, растворенный в изотоническом растворе хлористого натрия.

Сальмозан является иммуномодулятором. Применение сальмозана способствует увеличению синтеза иммуноглобулина класса G и A. Бактериальные ЛПС, в частности сальмозан, усиливают кооперацию Т- и В-лимфоцитов с макрофагами, увеличивают образование клеток иммунологической памяти у животных иммунизированных корпускулярными или растворимыми антигенами, стимулируют фагоцитарную активность макрофагов. В итоге возрастают их размеры, активность лизосомальных ферментов, киллерная активность макрофагов и продукция факторов, активизирующих Т-лимфоциты и ингибирующих пролиферацию В-лимфоцитов. Препарат применяют для повышения неспецифической резистентности организма домашних животных к инфекционным болезням. Применяют его подкожно и внутримышечно, возможно пероральное применение. Разовая действующая доза для взрослых животных составляет 1 см<sup>3</sup>, для молодняка -0,5 см<sup>3</sup>.

**Сальмопул** - представляет собой полисахаридно-пептидную фракцию, полученную из биомассы сальмонеллезных бактерий серогруппы D], которая является вторичным сырьем от производства антигена пуллорного эритроцитарного. Установлено, что препарат стимулирует неспецифическую и специфическую гуморальную иммунную защиту - лизоцимную, бактерицидную активность сыворотки крови, образование иммуноглобулинов, особенно классов G и A. Кроме того, препарат усиливает лейкопоз, фагоцитарную активность микро- и макрофагов, образование Т- и В-лимфоцитов.

**Альвеозан** - изготовлен из липополисахарида спорообразующих аэробных микроорганизмов *Vac. alvei*, не имеющих контакта с организмом теплокровных животных и непатогенными для них. Препарат стимулирует специфический и неспецифический иммунитет – усиливает лейкопоз, фагоцитарную активность нейтрофилов и моноцитов, повышает количество Т- и В-лимфоцитов и их субпопуляций, лизоцимную, бактерицидную активность сыворотки крови, количество бета-лизинов, иммуноглобулинов М, G и А-классов, интерферона.

Препарат не обладает раздражающим и аллергическим действием. В рекомендуемых дозах не вызывает побочного действия.

**Иммуновет** – липополисахарид из *Vac.subtilis*. стимулирует специфический и неспецифический иммунитет – активизирует поствакцинальный иммунитет, усиливает фагоцитарную активность нейтрофилов и моноцитов, повышает количество Т- и В-лимфоцитов и их субпопуляций, стимулирует лизоцимную, бактерицидную активность сыворотки крови, количество бета-лизинов, иммуноглобулинов М, G и А-классов, интерферона. Не обладает раздражающим и аллергическим действием. В рекомендуемых дозах не вызывает побочного действия.

#### Литература.

1. Дранкин Г.Н., Гриневич Ю.А., Дизик Г.М. *Иммуотропные препараты.*— Киев: Здоров'я, 1994.— 228 с.
2. Ермольева З.В. *Антибиотики. Интерферон. Бактериальные полисахариды / З.В.Ермольева*— М.: Медицина, 1965.— 384 с
3. К вопросу повышения резистентности крупного рогатого скота воздействием иммунокорректирующими полисахаридами / С.А Нефедова [и др.] // *Материалы всерос.науч.-произв.конф."Инновац.технологии в аграр. образовании, науке и АПК России". -Ульяновск, 2003; Ч.2. - С. 251-252*

4. Красочко, П.А. Иммунологическая оценка бактериальных полисахаридов, полученных из бацилл / П.А.Красочко, В.А. Машеро // "Инфекция и иммунитет". Материалы Республ. научно-практ. конф., посв. 75-летию БелНИИЭВ. 9-10 декабря 1999 г. Минск, БИТ "Хата", 1999. - С.505-507

5. Красочко, П.А. Влияние бактериального липополисахарида на клеточный иммунитет и продуктивность телят / П.А.Красочко // Использование физических и биологических факторов в ветеринарии и животноводстве. Матер. Всес.научн.конф. 11-12 сентября 1991 г. Москва 1992.- С.53-54.

6. Красочко, П.А. Стимуляция иммунной системы телят бактериальным липополисахаридом для профилактики респираторных инфекций / П.А.Красочко// Профилактика и меры борьбы с болезнями молодняка сельскохозяйственных животных. Тез. докл. научн.-произв. конф. Витебск, 12-13 сентября 1990 г. Минск, 1990.- С.112-113.

7. Методические рекомендации по использованию бактериальных липополисахаридов для стимуляции иммунной системы животных / П.А.Красочко[и др.] – УП «Арти-Фекс», Минск, 2013. – 40 С.

8. Шляхов Э.Н., Кику В.Ф. Стимуляция поствакцинального иммунитета /Э.Н.Шляхов, В.Ф.Кику— Кишинев: Штиинца, 1984.— 200 с.

## **БИОПЛЕНКОВАЯ АНТИБИОТИКОВАЯ ТОЛЕРАНТНОСТЬ И БИОПЛЕНКОИНГИБИРУЮЩЕЕ ДЕЙСТВИЕ НАНОЧАСТИЦ**

**КРАСОЧКО П.А., КОРОЧКИН Р.Б., ГВОЗДЕВ С.Н.**

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

Большинство бактерий существуют в состоянии биопленок, представляющих собой трехмерные бактериальные консорциумы, заключенные во внеклеточную полимерную субстанцию и прикрепленные субстрату. Внутри биопленок бактерии значительно менее чувствительны к защитному воздействию со стороны хозяина, что затрудняет диагностику и лечение инфекций. Многие хронические инфекции связаны с формированием в организме инфицированного животного бактериальных биопленок. Кроме того, в таком состоянии микроорганизмы на несколько порядков более устойчивы к действию антибактериальных препаратов.

**Ключевые слова:** биопленки, биопленковая антибиотиковая толерантность, ингибция, наночастицы.

## **BIOFILM ANTIBIOTIC TOLERANCE AND THE INHIBITING EFFECT OF NANOPARTICLES**

**KRASOCHKO P.A., KOROCHKIN R.B., GVOZDEV S.N.**

Vitebsk state academy of veterinary medicine, Vitebsk, Republic of Belarus

Most bacteria live in biofilms, three-dimensional bacterial consortia, enclosed in an extracellular polymeric substance and attached to a substrate. Within biofilms, bacteria are significantly less sensitive to host defense, making it difficult to diagnose and treat infections. Many chronic infections are associated with the formation of bacterial biofilms in the body of an infected animal. In addition, in this state, microorganisms are several orders of magnitude more resistant to the action of antibacterial drugs.

**Keywords:** biofilms, microorganisms, biofilm antibiotic tolerance, inhibition, nanoparticles.

**Введение.** Изучение микробных биопленок имеет первостепенное значение в широком спектре отраслей, в том числе связанных с производством продуктов питания и кормов, гигиеной, медициной и фармацевтикой. Образование биопленок является важным механизмом вирулентности в патогенезе многих важных бактериальных патогенов, таких как *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* и многих других [3]. Число патологий, приписываемых биопленкообразованию, велико. Некоторые примеры таковых включают вагинит, колит, конъюнктивит, гингивит, уретрит и отит. Фактически, около 80% всех микробных инфекций у людей и животных являются прямым результатом формирования бактериальных биопленок в патологическом очаге. Одной из особенных характеристик бактерий в биопленковом состоянии является повышенная их устойчивость к действию антимикробных препаратов.