

ленности / Ю. П. Фомичев [и др.]. – Москва : Научная библиотека, 2017. – 702 с. 5. Контроль качества и безопасности пищевых продуктов методом ВЭЖХ / А. Я. Яшин [и др.] // Лаборатория и производство. – 2019. – № 1. – С. 78-90. 6. Амперометрическое детектирование антиоксидантной активности модельных и биологических жидкостей / А. А. Савина, О. А. Воронина, Н. В. Боголюбова, С. Ю. Зайцев // Вестник Московского университета. Серия 2: Химия. – 2020. – Т. 58, № 2. – С. 97-103. 7. Comparative study of the water-soluble antioxidants in fodder additives and sheep blood serum by amperometric and biochemical methods / S. Y. Zaitsev [et al.] // Animals. – 2020. – Т. 10. – № 7. – С. 1186. 8. Юрова, Е. А. Современные инструментальные методы контроля молочной продукции / Е. А. Юрова, Т. В. Кобзева // Пищевая промышленность. – 2011. – № 4. – С. 38-40. 9. Зайцев, С. Ю. Биологическая химия: от биологически активных веществ до органов и тканей животных / С. Ю. Зайцев. – Москва : ЗАО «Капитал Принт», 2017. – Т. 507. 10. Зайцев, С. Ю. Тензиометрический и биохимический анализ крови животных: фундаментальные и прикладные аспекты / С. Ю. Зайцев. – Дубровицы, 2016. – 192 с. 11. Comprehensive analysis of the colloid biochemical properties of animal milk as complex multicomponent system / S. Y. Zaitsev [et al.] // BioNanoScience. – 2017. – Т. 7. – С. 26-31. 12. ТР ТС 033/2013 Технический регламент Таможенного союза "О безопасности молока и молочной продукции" (с изменениями на 10 июля 2020 года). 13. Матвеева, Т. А. Исследование качественных характеристик молока питьевого / Т. А. Матвеева, И. Ю. Резниченко // Достижения и перспективы научно-инновационного развития АПК. – 2022. – С. 549-552. 14. Рекомендации по контролю физиологического состояния и здоровья коров с использованием биомаркеров состава молока / А. А. Сермягин, Г. Г. Карлюкова, И. А. Лашнева, М. В. Корнелеева. – Дубровицы : ФГБНУ ФИЦ ВИЖ им. Л.К. Эрнста, 2022. – 52 с. 15. Hamed, H. Total and differential bulk cow milk somatic cell counts and their relation with antioxidant factors / H. Hamed, A. El Feki, A. Gargouri // Comptes rendus biologiques. – 2008. – Т. 331. – № 2. – С. 144-151. 16. Зайцев, С. Ю. Антиоксидантная активность молока / С. Ю. Зайцев. – Дубровицы : ФГБНУ ФИЦ ВИЖ им. Эрнста, 2022. – 56 с.

Поступила в редакцию 26.10.2023.

УДК 57.085.23:612.017.1:615.076 (043.3)

ОЦЕНКА БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ЛИПОЛИСАХАРИДОВ *BACILLUS SUBTILIS* ПО ЭКСПРЕССИИ ПОВЕРХНОСТНЫХ МАРКЕРОВ ИММУНОКОМПЕТЕНТНЫХ КЛЕТОК

*Красочко П.А., **Гончаров А.Е., **Дуж Е.В., *Красочко И.А., *Чайковский В.В., ***Попова П.Ю.

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

**ГНУ «Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси», г. Минск, Республика Беларусь

***ФГБОУ ВО «Смоленская государственная сельскохозяйственная академия», г. Смоленск, Российская Федерация

Целью настоящих исследований является оценка иммуностимулирующего действия липополисахарида из *Bacillus subtilis* по экспрессии поверхностных маркеров иммунокомпетентных клеток. Установлено, что уровень экспрессии молекул CD80, CD86, CD273 и HLA-DR на дендритных клетках (ДК) был в 1,5-2 раза выше ($p < 0,05$) при сравнении с соответствующей контрольной группой, что свидетельствует об иммунобиологической активности липополисахарида из *Bacillus subtilis*. **Ключевые слова:** липополисахарид, *Bacillus subtilis*, дендритные клетки, поверхностные маркеры иммунокомпетентных клеток.

EVALUATION OF THE BIOLOGICAL ACTIVITY OF *BACILLUS SUBTILIS* POLYSACCHARIDES BY THE EXPRESSION OF SURFACE MARKERS OF IMMUNOCOMPETENT CELLS

*Krasochko P.A., **Hancharou A.Y., **Duzh E.V., *Krasochko I.A., *Tchaikovsky V.V.,

***Popova P.Yu.

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

**Institute of Biophysics and Cellular Engineering of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus

***Smolensk State Agricultural Academy, Smolensk, Russian Federation

The aim of these studies is to evaluate the immunostimulating effect of lipopolysaccharide from *Bacillus subtilis* on the expression of surface markers of immunocompetent cells. It was found that the expression level of CD80, CD86, CD273 and HLA-DR molecules on dendritic cells (DC) was 1,5-2 times higher ($p < 0,05$) when compared with the corresponding control group, which indicates the immunobiological activity of lipopolysaccharide from *Bacillus subtilis*. **Keywords:** lipopolysaccharide, *Bacillus subtilis*, dendritic cells, surface markers of immunocompetent cells.

Введение. Успехи иммунологии последних лет способствовали совершенствованию существующих и получению новых эффективных препаратов для иммунизации человека и животных. Бурное развитие иммунологии, микробиологии, химии (органического и неорганического синтеза), фармакологии и других смежных наук привело к тому, что появилось новое направление в иммунологии – иммунологическая регуляция. Приемы иммунотерапии, направленные на исправление дефекта иммунорегуляции, можно объединить общим термином «иммунокоррекция». Для обозначения отдельных ее направлений используются такие термины, как «иммунорегуляция», «иммуно-

стимуляция», «иммуносупрессия», «иммунопотенцирование» («иммуноадъювантная терапия»), «иммуноадаптация», «иммунореабилитация» (Н.Н. Дранник с соавт., 1994).

В последние годы внимание исследователей привлекают бактериальные липополисахариды (ЛПС).

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.

Широкий спектр биологической активности ЛПС связывают с широким диапазоном молекулярных масс, констатируя, что физиологическая активность хорошо коррелирует с величинами молекулярных масс. Так, низкомолекулярные ЛПС (5000 - 15000) имеют тенденцию к проявлению антикомплементарной активности, в то время как высокомолекулярные (75000-125000) стимулируют ретикулоэндотелиальную систему. Антикомплементарная активность сводится к тому, что формирование мембраноатакующего комплекса происходит на О-специфических полисахаридных цепях, а не на мембране бактериальной клетки. Это защищает бактерию от лизиса.

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.

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.

Рассматривая механизм неспецифического иммуностимулирующего действия компонента микробных клеток, большинство авторов считают, что они преимущественно действуют на популяцию В-клеток, а также активируют синтез неспецифических иммуноглобулинов. Взаимодействие ЛПС со специфическими рецепторами на поверхности В-лимфоцитов сопровождается увеличением поступления ионов кальция внутрь этих клеток с последующим быстрым увеличением уровня циклического гуанидинмонофосфата и медленным нарастанием уровня циклического аденозинмонофосфата. Увеличение активности названных нуклеотидов приводит вначале к пролиферации (активность у ГМФ), а затем к дифференцировке (активность у АМФ) лимфоцитов в плазматические клетки, синтезирующие иммуноглобулины.

Установлено, что ЛПС напрямую активируют миелоцитарный росток костного мозга, одним из проявлений которого является мегакариоцитоз и лейкоцитоз, сменяющий кратковременную лейкопению. При повторяющихся эндотоксиновых атаках вновь развивается лейкопения (как следствие истощения резервов миелопоэза). Реакция костного мозга может реализовываться и вследствие действия колониестимулирующих факторов, освобождающихся из активированных ЛПС фибробластов и эндотелиальных клеток, которые ускоряют пролиферацию и дифференцировку ряда клеток. Благодаря способности ЛПС активировать фагоцитирующие клетки происходит выброс лизосомальных ферментов, 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. Последний может усиливаться способностью ЛПС обуславливать активацию синтеза гамма-интерферона, фибронектина и СЗб-компонента комплемента, которые являются мощными опсонинами. Однако стимулирующим эффектом на мононуклеарные фагоциты обладают лишь низкие дозы ЛПС, тогда как более высокие, напротив, блокируют их основные функции. Дисфункция системы фиксированных макрофагов печени является одним из ключевых звеньев в развитии самой тяжелой системной реакции организма на ЛПС – эндотоксинового шока. Хорошо известны адъювантные 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).

Учитывая высокую биологическую активность бактериальных ЛПС, возникает необходимость оценки иммуностимулирующей активности этой группы иммуностимуляторов.

Известно, что при воздействии на иммунокомпетентные клетки различных иммуностимулирующих веществ происходят экспрессии поверхностных маркеров и изменения их иммунофенотипа.

Целью настоящих исследований является оценка иммуностимулирующего действия липополисахарида из *Bacillus subtilis* по экспрессии поверхностных маркеров иммунокомпетентных клеток.

Материалы и методы исследований. Исследования проводились на базе кафедр микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и инфекционных болезней УО «Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины» и лаборатории иммунологии и вирусологии ГНУ «Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси».

Объекты исследований. В исследованиях использовали ЛПС из *Bacillus subtilis* (10,2 mg/ml), периферическую кровь доноров, дендритные клетки (ДК).

Материалы и реагенты. В работе использовали следующие реагенты:

- антикоагулянты: натриевая соль гепарина («Белмедпрепараты», РБ);

- питательные среды и буферные растворы:

1) DPBS для отмывки клеток, не содержащий ионов двухвалентных металлов (Biowest, Франция);

2) бессывороточная среда AIM-V для роста клеток (Gibco, США) с добавлением 0,3 г/л L-глутамина (Lonza, Швейцария), 10 mM HEPES (Gibco, США);

- ЛПС из *Bacillus subnilis* (10,2 mg/ml);

- другие реагенты: градиент плотности «фиколл-пак» (1077 г/л) (Biowest, Франция), АВ0-сыворотка (РНПЦ трансфузиологии и медицинских биотехнологий);

- моноклональные антитела к антигенам человека: CD80, конъюгированное с FITC; CD86, конъюгированное с PE; CD209, конъюгированное с APC; CD273, конъюгированное с PerCP-eFl10; HLA-DR, конъюгированное с PE-Cy7.

Оборудование:

- инкубатор углекислотный C150 (Bioder, США);

- шкаф ламинарный BA safe-1.2 (Белаквилон, РБ);

- центрифуга MPW (MPW-260R, Китай);

- микроскоп инвертированный (BestScope, Китай);

- цитометр Attune NxT (ThermoFisher, США).

В работе использовали следующие программы: Statistica, версия 12 (StatSoft, США); FCS Express, версия 7 (DeNovo Software, США), «StatPlus» 4.9 («AnalystSoft», США).

Бактериальный липополисахаридиз штамма-продуцента *Bacillus subtilis* КМИЭВ - В 197 получают путем термогидролиза в 1 %-ном растворе гидроксида натрия при 100 °С в течение 60 мин., после остывания реакционной смеси до 20-22 °С осуществляют центрифугирование при 8000-10000 об/мин в течение 10 мин., доводят pH надосадочной жидкости до 1,0- 2,0 с помощью 5 %-ного раствора соляной кислоты. После образования осадка, который отделяют от надосадочной жидкости центрифугированием при 8000-10000 об/мин в течение 10 мин., а полученный липополисахарид растворяют в деионизированной воде при pH 9,0 при следующем соотношении ингредиентов, мас. %: липополисахарид штамма-продуцента *Bacillus subtilis* КМИЭВ - В 197 - 50 мг и деионизированная вода остальное. После этого полученный раствор стерилизуют путем мембранной фильтрации под давлением 0,1-0,5 атм через фильтровальную установку, снабженную мембраной с размером пор 0,2 мкм [5-7].

Забор донорской крови был проведен на базе Института биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси. Образцы венозной крови, объемом 50 мл каждый, помещали в маркированные стерильные полипропиленовые пробирки с антикоагулянтом – 100 мкл гепарина натрия.

Выделение мононуклеаров из периферической крови и получение незрелых ДК

В пропиленовые пробирки объемом 15 мл разливали стерильный градиент фиколл-пак с плотностью 1077 г/л в количестве 4 мл на пробирку. На градиент фиколл-пак аккуратно наслаивали 8 мл разведенной крови. Пробирки центрифугировали в течение 30 минут при 500g для разделения фракций. После центрифугирования слой плазмы удаляли, затем собирали кольцо МПК (мононуклеары периферической крови). Клетки переносили в чистую пропиленовую пробирку, доводили объем клеточной взвеси до 15 мл DPBS и отмывали дважды полученную суспензию клеток от градиента и тромбоцитов путем центрифугирования, 10 минут при 300g, производили подсчет в камере с сеткой Горяева.

Моноциты выделяли из фракции МПК методом адгезии. Взвесь мононуклеаров (3×10^6 /мл) в питательной среде разливали по 12-луночным планшетам. Клетки инкубировали в CO₂ инкубаторе 45 минут для полной адгезии моноцитов. После этого среду с неприкрепившимися клетками удаляли и отмывали лунки от лимфоцитов DPBS. Выделенные МПК культивировали в питательной среде AIM-V с добавлением цитокинов: 100 нг/мл ГМ-КСФ и 50 нг/мл ИЛ-4 при 37 °С в увлажненной атмосфере с 5 % CO₂ в течение 6 суток. Затем добавляли исследуемые полисахариды.

Через сутки анализировали иммунофенотип и морфологию клеток.

Инкубация клеток с бактериальным ЛПС из *Bacillus subtilis*

Исследования проводили в 3–6-кратных повторах. Взвесь культуры ДК разливали по лункам 12-луночного планшета. В лунки помещали следующие вещества: лунка 1 – отрицательный контроль ДК, лунки 2–4 – ДК с рабочими растворами исследуемых веществ бактериального ЛПС из *Bacillus subtilis* в концентрации 10 мкг/мл. Рабочие растворы с полученной концентрацией готовили непосредственно перед исследованием.

Для *in vitro* исследований использовали концентрации на порядок ниже, поэтому для ЛПС из *Bacillus subtilis* делали несколько разведений, после чего оценивали их влияние на ответимость полисахаридов.

Планшеты с ДК инкубировали при 37 °С в увлажненной атмосфере с 5 % CO₂ на протяжении 24 часов.

По завершении времени культивирования культуры суспендировали в лунках, взвесь помещали в пробирки, отмывали дважды в DPBS и суспендировали в 1 мл DPBS.

Определение поверхностных и внутриклеточных маркеров клеток

На поверхности ДК была исследована экспрессия следующих молекул:

- 1) молекул ГКС II класса – HLA-DR,
- 2) костимуляторных молекул CD80 и CD86,
- 3) коингибиторных молекул CD273,
- 4) маркер дифференцировки ДК – CD209.

При определении экспрессии поверхностных молекул клетки инкубировали с моноклональными антителами 15 мин. при +4°C в темноте. Несвязавшиеся антитела отмывали путем центрифугирования в DPBS, после чего супернатант удаляли, а клетки ресуспендировали в 250 мкл DPBS. Учет производили на проточном цитофлуориметре.

Методы статистической обработки данных

Для статистической обработки полученных данных применяли программное обеспечение «Statistica», версия 10–12 («StatSoft», США), «StatPlus» 4.9 («AnalystSoft», США). Значения показателей преимущественно представлены в виде Me (25 – 75), где Me – медиана, а 25 и 75 – интерквартильный размах в виде 25-й и 75-й процентилей. Для сравнения двух независимых выборок использовали U-критерий Манна-Уитни. В качестве критерия достоверности различий показателей принимался уровень значимости $p < 0,05$.

Результаты исследований. При оценке стимулирующего действия ЛПС из *Bacillus subtilis* учитывали следующие поверхностные маркеры иммунокомпетентных клеток:

HLA-DR (МНС-II) – главный комплекс гистосовместимости (МНС) класса II, антигенпредставляющая молекула для представления пептидных антигенов.

CD80 (B7-1) – мембранный белок суперсемейства иммуноглобулинов, связывается с CD28 и CTLA-4 с низкой аффинностью и быстрой кинетикой связывания, что позволяет быстрые взаимодействия между коммуницирующими клетками, экспрессируется на дендритных клетках.

CD86 – мембранный белок суперсемейства иммуноглобулинов, экспрессированный на антигенпредставляющих клетках, который действует как ко-стимулирующий сигнал для активации Т-лимфоцитов.

CD209 маркер дифференцировки ДК, представляющий собой рецептор лектина С-типа.

CD273 (B7-DC, PD-L2) – молекула B7-DC, экспрессируется на ДК, регуляторных В-клетках, макрофагах, мезенхимальных стволовых клетках, клетках опухолей, в том числе некоторых перевиваемых клеточных линиях.

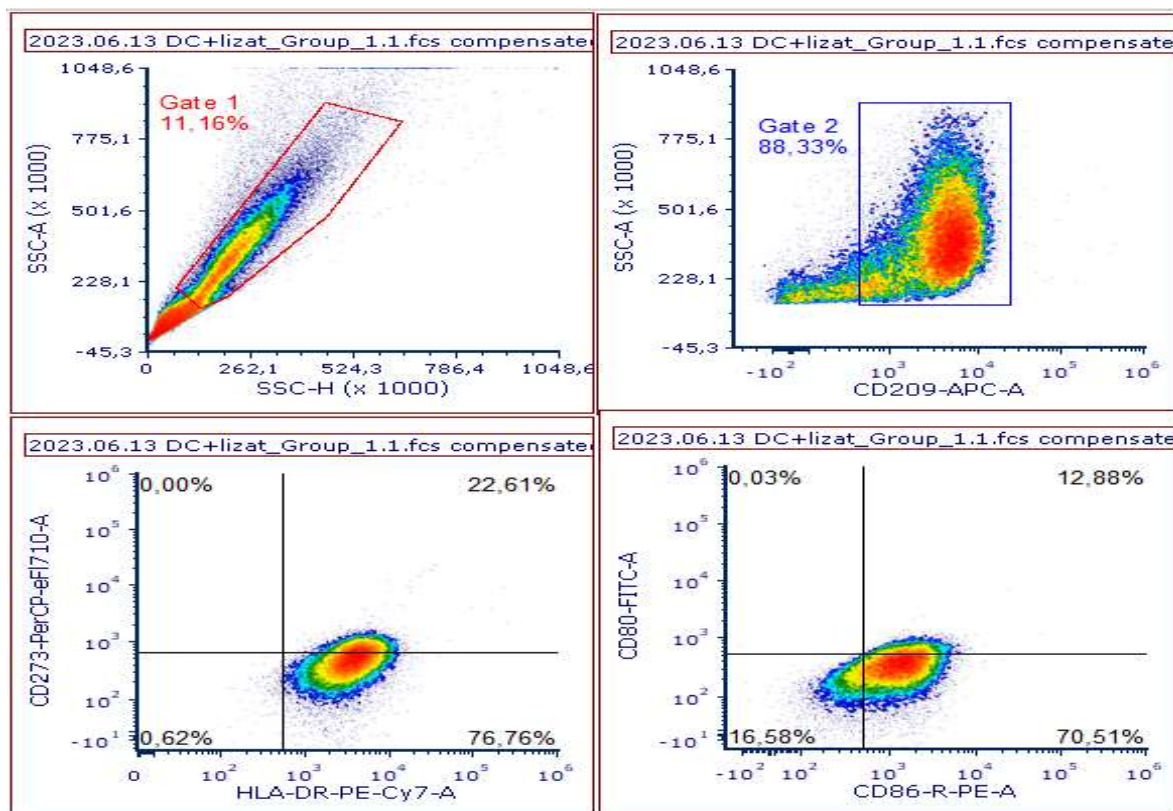


Рисунок 1 – Анализ иммунофенотипа ДК, культивированных с полисахаридом из *Bacillus subtilis*

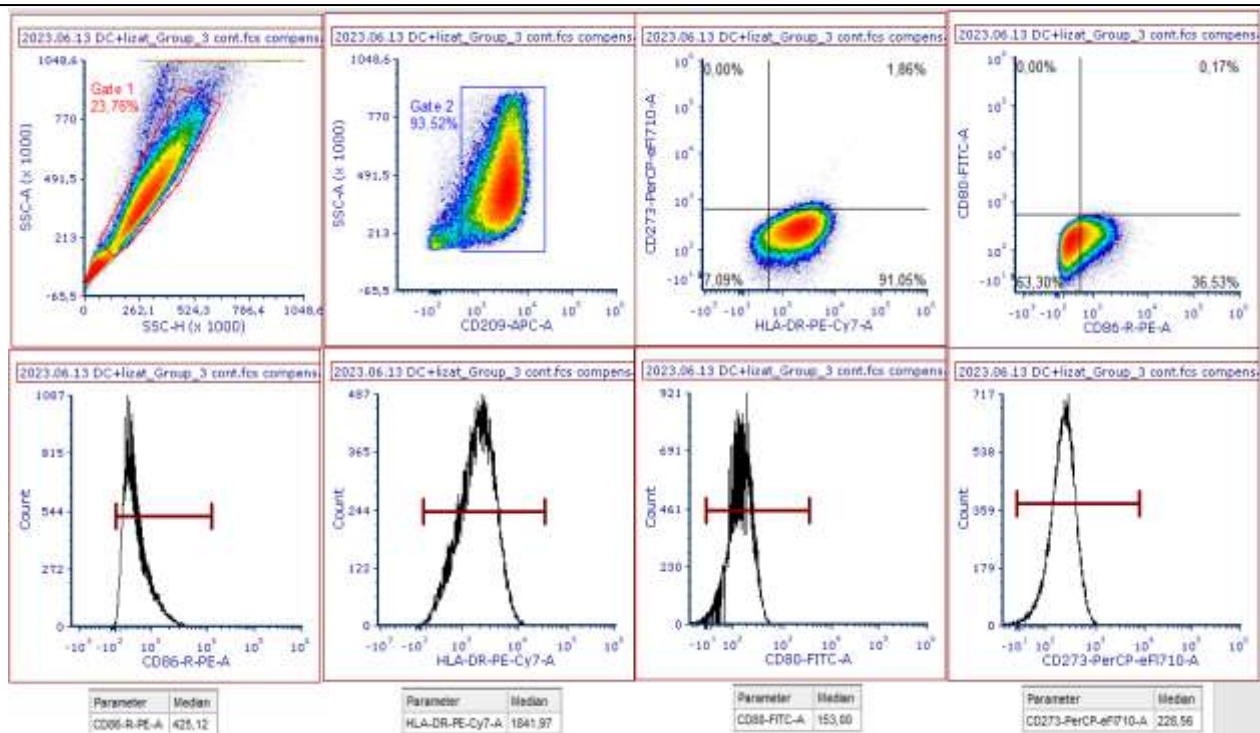


Рисунок 2 – Анализ иммунофенотипа ДК (контроль)

Таблица – Сравнительные данные иммунофенотипирования ДК ЛПС из *Bacillus subtilis*

Образцы	CD86	HLA-DR	CD80	CD273
контроль				
Me(25-75)	421(338-495)	1829(1056-1844)	151(122-163)	244(226-353)
<i>Bacillus subtilis</i> (10,2 mg/ml)				
Me(25-75), усл. ед.	700(527-1234)	2226(1996-3800)	227(222-287)	421(365-432)
Mann-Whitney U Test, p	0,049534613	0,049534613	0,049534613	0,049534613

Полученные результаты проведенных исследований, представленные в таблице, показали иммунобиологическую активность исследованного ЛПС из *Bacillus subtilis*.

Заключение. Уровень экспрессии молекул CD80, CD86, CD273 и HLA-DR на дендритных клетках (ДК) был в 1,5-2 раза выше ($p < 0,05$) при сравнении с соответствующей контрольной группой, что свидетельствует об иммунобиологической активности липополисахарида из *Bacillus subtilis*.

Литература. 1. Патент Республики Беларусь № 22861. Иммуностимулирующий препарат для сельскохозяйственных животных / П. А. Красочко, М. В. Якубовский, Д. С. Борисовец, И. А. Красочко, Н.Ю., Щемелева, Г.Е. Толяронок, Е.С. Журавлева, Т.А. Зуйкевич / Заявл. № а 20140748 от 31.12.2014 г., опубликовано : 28.02.2020. - Минск, 2020. – 6 с. 2. Патент Республики Беларусь № 22883. Способ получения иммуностимулирующего препарата для сельскохозяйственных животных / П. А. Красочко, М. В. Якубовский, Д. С. Борисовец, И. А. Красочко, Н. Ю. Щемелева, Г. Е. Толяронок, Е. С. Журавлева, Т. А. Зуйкевич / Заявл. № а20140749 от 31.12.2014 г., опубликовано : 28.02.2020. - Минск, 2020. – 6 с. 3. Патент Республики Беларусь № 22882. Штамм *Bacillus subtilis* – продуцент липополисахаридов, используемых для получения иммуностимулирующих препаратов для животных / П. А. Красочко, М. В. Якубовский, Д. С. Борисовец, И. А. Красочко, Н. Ю. Щемелева, Г. Е. Толяронок, Е. С. Журавлева, Т. А. Зуйкевич / Заявл. № а 20140747 от 31.12.2014 г., опубликовано : 28.02.2020. - Минск, 2020. – 6 с. 4. Amodio, G. The discovery of HLA-G-bearing extracellular vesicles: new perspectives in HLA-G biology / G. Amodio, S. Gregori // Ann. Transl. Med. - 2017. - Vol. 5 (6). - P.148. 5. CD80 and CD86 knockdown in dendritic cells regulates Th1/Th2 cytokine production in asthmatic mice / J.-G. Li [et al.] // Experimental and Therapeutic Medicine. - 2016. - Vol. 11 (3). - P. 878–884. 6. Rajesh, K. DC-SIGN Family of Receptors / K. Rajesh, G. S. Gupta // Animal Lectins: Form, Function and Clinical Applications. - 2012. - Vol. 20. - P. 773-798. 7. Expression of B7-family co-inhibitory molecules by dendritic cells from pancreatic cancer patients / A. Y. Hancharou, [et al.] // J. Allergy and Clinical Immunology. - 2019.

Поступила в редакцию 30.09.2023.