

УДК 619:636.09:633.88

УТОЧНЕНИЕ НЕКОТОРЫХ БИОДИНАМИЧЕСКИХ ПАРАМЕТРОВ КОМПЛЕКСА КОЛЛОИДНОГО СЕЛЕНА КОНЪЮГИРОВАННОГО С ЛАКТОФЕРРИНОМ IN VITRO

*Исаева А.Ю., ***Староверов С. А., *Волков А. А., ****Субботин А.М., ***Козлов С. В.

*ФГБОУ ВПО «Саратовский государственный аграрный университет им. Н.И. Вавилова»,

**Саратовский научно-исследовательский ветеринарный институт РАСХН,

***Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН, г. Саратов,

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

В работе изучается влияние композиции на основе коллоидного селена конъюгированного с лактоферрином для повышения стимулирующего влияния на клеточный и гуморальный иммунитет.

The work is devoted to the study of composition on the basis of colloidal selenium with lactoferrin which stimulates the immunity.

Введение. В последнее время большое внимание уделяется использованию в ветеринарной медицине биологически активных веществ природного происхождения, обладающих антимикробным и иммунопротективным действием. Данные соединения позволяют снизить количество применяемых хемотерапевтических средств и тем самым повысить качество получаемой сельскохозяйственной продукции [1-3].

Одним из таких веществ является лактоферрин – белок сыворотки молока млекопитающих, железосвязывающий многодоменный, полифункциональный гликопротеид. Наибольший спектр биологической активности обнаружен у пептидных фрагментов лактоферрина, получаемых при его протеолизе [4]. По литературным данным продукты протеолиза лактоферрина обладают целым рядом биоактивных свойств, обнаруженных in vitro. Так, они являются фактором опсонизации и усиления завершенности фагоцитоза, обладают антимикробной, антивирусной, противогрибковой и противогельминтной активностью, тормозят адгезию бактерий на клетках макроорганизма [5-7]. Все перечисленные выше свойства делают лактоферрин интересным объектом для изучения и использования в фармакологии. Однако, многие вопросы, касающиеся лактоферрина и его использования, до сих пор остаются недостаточно изученными.

Особый интерес представляет микроэлемент селен. В организме нет такого органа или системы, где не использовался бы селен. Этот микроэлемент участвует в обмене белков и нуклеиновых кислот, входит в состав ферментов и гормонов, участвует в реакциях иммунитета, воспаления и регенерации. Селеносодержащие белки формируют костную и хрящевую ткани, поддерживают работу скелетных и гладких мышц, контролируют гормональный баланс. Все перечисленные выше свойства делают селен интересным объектом для изучения и использования в фармакологии. Вместе с тем многие вопросы, касающиеся влияния коллоидного селена на иммунную систему, до сих пор остаются недостаточно изученными. Коллоидные частицы имеют некоторое преимущество перед другими наночастицами, благодаря своему малому размеру (от 5 до 100 нм), большой свободной поверхности, низкой токсичности, клеточной пенетрабельности и возможности поверхностной модификации.

В связи с этим мы поставили целью в начале нашей работы изучить некоторые биодинамические параметры комплекса коллоидного селена, конъюгированного с лактоферрином in vitro.

Материалы и методы. Коллоидный селен синтезировался нами по методу Bo Huang et al (2003). Используемые в работе культуры клеток почеч эмбрионов свиньи (SPEV) получены из криобанка коллекции клеточных культур лаборатории вирусологии научно-исследовательского ветеринарного института Российской академии сельскохозяйственных наук (РАСХН) (Саратов). Культивирование клеточных культур проводили в пластиковых флаконах в полной RPMI среде (10% эмбриональной сыворотки, гентамицин, ампициллин, амфотерицин) при 37° С. Диссоциация клеток монослойной культуры достигалась промыванием монослоя раствором трипсина в течение 10 мин.

Выделение и культивирование перитонеальных макрофагов и клеток селезенки проводилось по стандартным методикам (Пастер Е.У., Овод В.В., Позур В.К., Вихоть Н.Е., 1989). Пролиферативную активность клеток селезенки проверяли по методу, предложенному Кузаковой Н. А. (2002) и Berridge V. M. (1996).

МТТ-тест проводили по следующей методике: чистую культуру клеток и клетки с добавлением препаратов инкубировали по 500 мкл в пробирках эппендорф при 37°С в течение 48 часов. Каждую пробирку с клеточными суспензиями по окончании инкубирования центрифугировали 10 мин при 1000 g. Перерастворяли полученный осадок в 500 мкл раствора МТТ и инкубировали в течение часа. После инкубации клетки перерастворяли в 500 мкл ДМСО, отбирали по 200 мкл суспензии из каждой пробирки и помещали в лунки 96-луночного плоскодонного планшета. Показания оптической плотности считывали на планшетном ридере Multiscan Ascent Thermo (Scientific) (Bernas T., Dobrucki J.W., 2000).

При изучении взаимодействия коллоидного селена с перитонеальными и лимфоидными клетками к 1 мл клеточной суспензии с количеством клеток $1 \cdot 10^8 - 10^9$ вносится 0,5 конъюгат селена с лактоферрином с концентрацией белка 1мг на мл перерастворенный в полной RPMI среде. В работе использовали следующие контроли: клетки с селенитом натрия, клетки культивируемые с ФГА и чистые клетки (клетки без внесённых препаратов). Ставится на ночь в термостат 37°С. На следующий день клетки собираются, центрифугированием отмываются и проводится измерение МТТ-теста.

При изучении влияния коллоидного селена на окислительно-восстановительные процессы клеток препарат вносился в монослойную культуру клеток в концентрации 1 мг на 10 мл среды. Культивирование проводили в течение 48 часов, после чего клетки снимались трипсинизацией, и у них определялась интенсивность дыхания в МТТ тесте.

При изучении влияния препарата на дыхательную активность клеток в качестве контроля использовали 100 мкл клеточных суспензий в 1 мл питательной среды. В качестве опыта использовали 100 мкл клеточных суспензий с препаратом (7,5 мкг/мл) в 1 мл питательной среды с антигеном. Итоговая концентрация клеток составила 2×10^7 клеток в 1 мл. Клетки культивировались в присутствии препарата в течение 24 – 72 часов (в зависимости от задачи) при 37°C.

Результаты. Исследование биологической активности комплекса коллоидного селена конъюгированного с лактоферрином, проводились на клеточной линии SPEV-2.

Культивирование клеток в присутствии нашей наноконпозиции, приводит к повышению их дыхательной активности в 4 раза (рисунок 58), что может говорить о способности препарата активировать окислительные процессы клеточного метаболизма.

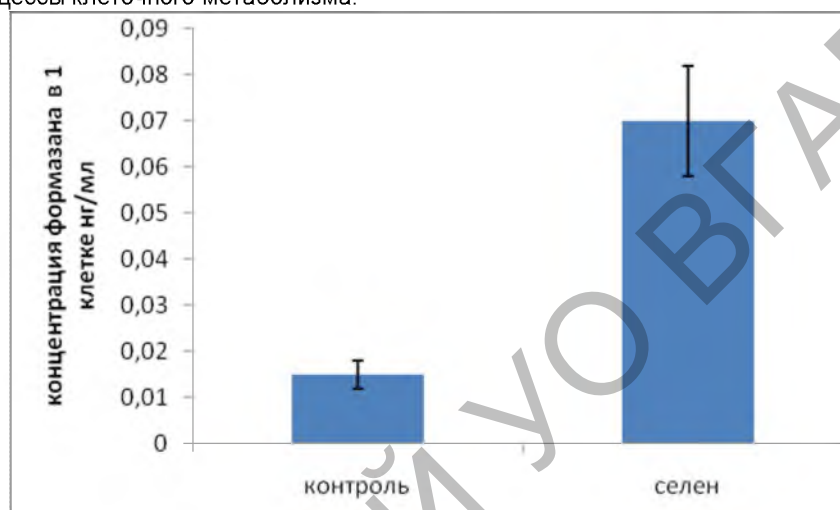


Рисунок 58 - Изменение дыхательной активности в клеточной популяции при культивировании их в присутствии препарата коллоидного селена ($P < 0,05$)

Отметив стимуляцию клеточного дыхания у клеток линии SPEV-2, мы в дальнейшем провели исследования по изучению влияния коллоидного селена на стимуляцию пролиферативной активности лимфоидных клеток.

Проведя данные исследования, мы отметили, что коллоидный селен вызывал повышение пролиферативной активности клеток на 91%, селенит натрия - на 9%, а фитогемагглютинин - на 26% по сравнению с контролем (рисунок 59).

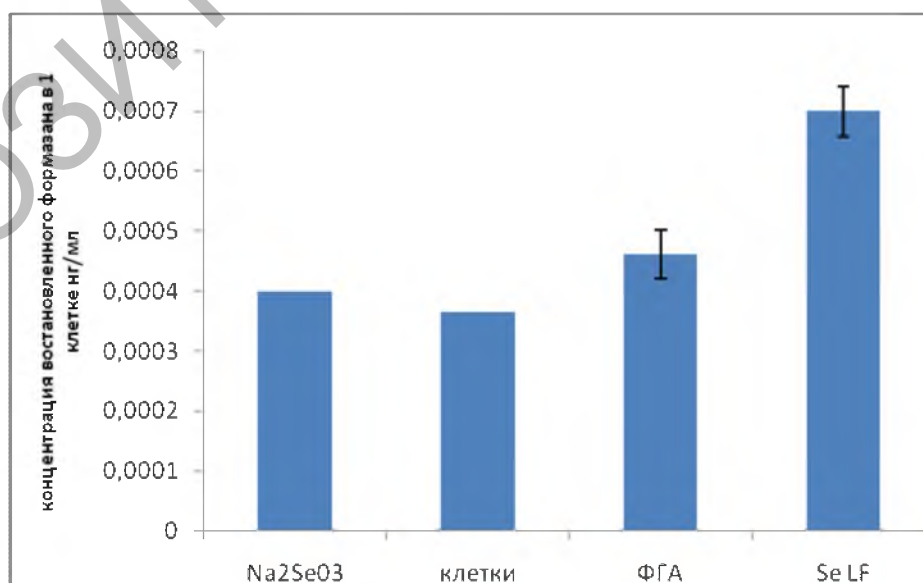


Рисунок 59 - Трансформирующая активность клеток селезенки крыс в присутствие конъюгатов коллоидного селена

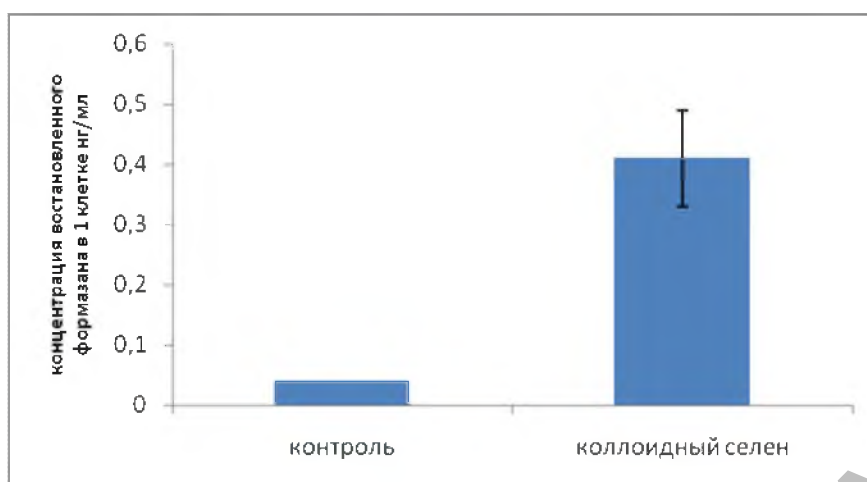


Рисунок 60 - Изменение дыхательной активности перитонеальных клеток крыс в присутствии конъюгатов коллоидного селена

Отметив дыхательную активность клеток селезенки, мы провели изучение влияния нашего препарата на дыхательную активность фагоцитирующих клеток, в частности, перитонеальных клеток крыс. На рисунке 60 можно отметить, что дыхательная активность перитонеальных клеток возрастает в присутствии нашего препарата в 10 раз, что может указывать на способность селена активировать клеточную активность.

Заключение. Анализируя полученные данные, хочется отметить, что данный комплекс обладает ярко выраженными иммуномодулирующими свойствами, что в дальнейшем позволит создать препараты, обладающие высокой биологической активностью и низкой токсичностью, и даст возможность провести конструирование иммуномодулирующих и вакцинных препаратов.

Литература. 1. Miedzobrodzki J., Naidu A. S., Watts J.L., Ciborowski P., Palm K., Wadsröm T. Effect of milk on fibronectin and collagen type I binding to *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci isolated from bovine mastitis // J. Clin. Microbiol. 1989. V. 27. P. 540-544. 2. Miyauchi H., Kaino A., Shinoda I., Fukuwatari Y., Hayasawa H. Immunomodulatory effect of bovine lactoferrin pepsin hydrolysate on murine splenocytes and Peyer's patch cells // J. Dairy Sci. 1997. V. 80. P. 2330-2339. 3. Holmgren J., Svennerholm A.M., Ahren C. Nonimmunoglobulin fraction of human milk inhibits bacterial adhesion (hemagglutination) and enterotoxin binding of *Escherichia coli* and *Vibrio cholerae* // Infect. Immun. 1981. V. 33. P. 136-141. 4. Dionysius D.A., Milne J.M. Antibacterial peptides of bovine lactoferrin: purification and characterization // J. Dairy. Sci. 1997. V. 80. P. 667-674. 5. Dionysius D.A., Grieve P.A., Milne J.M. Forms of lactoferrin: their antibacterial effect on enterotoxigenic *Escherichia coli* // J. Dairy Sci. 1993. V. 76. P. 2597-2606. 6. Naidu A.S. Lactoferrin: Natural, Multifunctional, Antimicrobial. - Boca Raton, FL: CRC Press, 2000. 86 p. 7. Zimecki M., Mazurier J., Machnicki M., Wieczorek Z., Montreuil J., Spik G. Immunostimulatory activity of lactotransferrin and maturation of CD4- CD8- murine thymocytes // Immunol. Lett. 1991. V. 30. P. 119-124.

Статья передана в печать 04.01.2013г.

УДК 619:636.09:633.88

ИЗУЧЕНИЕ ВОЗМОЖНОСТИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ КОЛЛОИДНОГО СЕЛЕНА В КАЧЕСТВЕ НАНОРАЗМЕРНОГО СРЕДСТВА ВНУТРИКЛЕТОЧНОЙ ДОСТАВКИ

*Исаева А.Ю., **** Староверов С. А., *Волков А. А., **** Субботин А.М., ** Козлов С. В.
 *ФГБОУ ВПО «Саратовский государственный аграрный университет им. Н.И. Вавилова»,
 ** Саратовский научно-исследовательский ветеринарный институт РАСХН,
 *** Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН, г. Саратов,
 **** УО «Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины»,
 Республика Беларусь, г. Витебск

В работе было выполнено конструирование наноразмерной частицы на основе селена и определены ее основные физико-химические.

The work contains results of construction of the nanopart on the basis of selenium. Its physico-chemical and biological features were estimated and determined as well.

Введение. Одной из важнейших проблем в фармацевтической отрасли остается адресная доставка лекарственных веществ, предназначенная для повышения эффективности лечения. Как известно, традиционные лекарственные формы содержат одно или несколько индивидуальных лекарственных веществ в формах, пригодных для энтерального или парентерального введения. Применяемые подходы к введению лекарств в организм человека и животных, основанные на использовании общепринятых лекарственных форм, имеют целый ряд существенных недостатков: