4. Identification of bioactive peptides after digestion of human milk and infant formula with pepsin and pancreatin / B. Hernández-Ledesma [et al.] // Int. Dairy J. – 2007. – Vol. 17, № 1 – P. 42–49.

5. Получение и характеристика антиоксидантной активности экстрактов Iris Domestica и их отдельных компонентов / А.П. Киселев // Труд. Белорусск. гос. ун-та. – 2012. – Т. 7. – С. 228–237.

ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ ПРЕПАРАТОВ РЕКОМБИНАНТНОГО ЛАКТОФЕРРИНА НА ИММУННУЮ СИСТЕМУ ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ

П.А. Красочко, Д.С. Борисовец, А.С. Ястребов, Л.Д. Андросик

РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского»,
Республика Беларусь
e-mail:bievm@tut.by

Ключевые слова: рекомбинантный лактоферрин, телята, иммунитет.

Аннотация. Проведена оценка эффективности влияния препарата рекомбинантного лактоферрина (ЛФ) на гуморальный иммунный ответ морских свинок. Установлено, что рекомбинантный лактоферрин не оказывает влияния на выработку противовирусных антител к вирусам диареи, инфекционного ринотрахеита, трансмиссивного гастроэнтерита и ротавируса свиней в организме иммунизированных морских свинок. В то же время, препарат повышает продукцию антибактериальных антител к штамму бактерий *Escherichia coli* A20, уровень которых на 2,33 $\log_2$ был выше по сравнению с титрами, полученными при иммунизации лабораторных животных *E. coli* без препарата.

Введение. В последнее время большое внимание уделяется использованию в ветеринарной медицине биологически активных веществ природного происхождения, которые позволяют снизить количество применяемых хемотерапевтических средств и, тем самым, повысить качество получаемой сельскохозяйственной продукции.

Одним из таких веществ является лактоферрин – белок сыворотки молока млекопитающих, железосвязывающий, многодоменный, полифункциональный гликопротеид (1).

К настоящему времени получено много экспериментальных данных и доказательств, указывающих на то, что этот белок обладает множественными физиологическими свойствами. К этим свойствам относятся регуляция гомеостаза ионов железа, защита организма от широкого спектра микробных инфекций, противовирусная и противовоспалительная активность лактоферрина, регуляция клеточного роста и дифференциация, противоопухолевая активность (8).

Помимо прямого защитного эффекта лактоферрина против бактерий, вирусов и эукариотических патогенов ряд экспериментов указывал на то, что этот белок является также модулятором иммунных процессов. Эти свойства лактоферрина в настоящее время получили многочисленные подтверждения в исследованиях in vitro и in vivo на животных и человеке, причем результаты некоторых опытов носят противоречивый характер (5, 7).

При изучении модуляционных процессов получение неоднозначных результатов вполне допустимо, потому что, положительный, негативный или нейтральный эффекты модулирующего агента находятся в прямой зависимости от текущего статуса организма, его состояния. Более того, в регуляционные процессы иммунитета вовлечено очень много факторов, что затрудняет проведение четкой дифференциации действия только молекулы ЛФ на исследуемый организм (3).

Исходя из этого, изучение влияния лактоферрина на различные звенья иммунного ответа в организме животного вызывает повышенный научный интерес и является актуальным предметом исследования.

Цель работы – оценка эффективности влияния препаратов рекомбинантного лактоферрина на гуморальный иммунный ответ морских свинок.

Материалы и методы. Исследования проводились в отделе вирусных инфекций РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского».

Для постановки эксперимента использовали рекомбинантный лактоферрин, полученный из молока трансгенных коз, изготовитель УО «Белорусский государственный университет» (2). Лакто-

феррин растворяли непосредственно перед применением в физиологическом растворе натрия хлорида. Концентрация рекомбинантного лактоферрина в препарате составляла 10 мг/мл.

В качестве антигенов для иммунизации лабораторных животных использовали аттенуированные штаммы вируса диареи КМИЭВ-V120, вируса инфекционного ринотрахеита КМИЭВ-V123, вируса трансмиссивного гастроэнтерита свиней КМИЭВ-10, ротавируса свиней КМИЭВ-11, а также инактивированный штамм бактерий *Escherichia coli* А20 КМИЭВ-39А, депонированные в коллекции микроорганизмов РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского».

Штаммы вируса диареи и инфекционного ринотрахеита крупного рогатого скота выращивали на перевиваемой культуре клеток почки эмбриона крупного рогатого скота MDBK, вируса трансмиссивного гастроэнтерита и ротавируса свиней – на перевиваемой культуре почки эмбриона свиньи СПЭВ. Инфекционный титр полученных в результате культивирования вирусов доводили до 6,5 lg $ТЦД_{50}$/мл.

Культуру штамма бактерий *Escherichia coli* А20 выращивали на мясо-пептонном агаре при температуре 37°С в течение 24 часов. Концентрацию бактериальных клеток доводили 0,85%-ным раствором хлористого натрия до 500 млн/мл. Инактивация бактерий проводилась формалином в 0,2%-ной концентрации с экспозицией 48 часов.

Для изучения влияния рекомбинантного лактоферрина на продукцию противовирусных и антибактериальных антител исследования были проведены на морских свинках живой массой 250-300 г в количестве 33 головы.

Животных разделили на 10 опытных и одну контрольную группу. Морским свинкам 1-ой, 3-ей, 5-ой и 7-ой опытных групп внутримышечно вводили аттенуированные штаммы вирусов – вируса диареи (ВД) крупного рогатого скота, инфекционного ринотрахеита (ИРТ), вирус трансмиссивного гастроэнтерита (ТГС) и ротавирус (РВ) свиней, соответственно, в дозе 1,0 $см^3$.

Морским свинкам 2-ой, 4-ой, 6-ой и 8-ой опытных групп одновременно вводили указанные вирусы и препарат рекомбинантного лактоферрина внутримышечно раздельно по 1,0 $см^3$. Животных 9-ой опытной группы внутримышечно иммунизировали инактивированным штаммом бактерий E.coli A20 в дозе 1,0 $см^3$. Животным

контрольной группы вводили 1,0 $см^3$ стерильного физраствора. Штаммы вирусов и бактерий, а также препарат рекомбинантного лактоферрина вводили двукратно с интервалом 14 дней.

До введения и через 14 дней после повторной иммунизации у животных отобраны пробы сыворотки крови. Титры противовирусных антител к вирусу диареи, ИРТ и ротавирусу определяли в реакции непрямой гемагглютинации (РНГА), к вирусу ТГС – в реакции нейтрализации (РН), антибактериальных – в реакции агглютинации (РА).

Результаты исследований и их обсуждение. После введения аттенуированных вирусов, инактивированного бактериального штамма и препарата рекомбинантного лактоферрина изменений общего состояния лабораторных животных и клинического проявления заболевания не выявлено.

Результаты экспериментов по изучению эффективности влияния рекомбинантного лактоферрина на гуморальный иммунный ответ морских свинок представлены в таблице.

В результате постановки РНГА установлено, что при введении вируса диареи и его применении совместно с Лф в 1-ой и 2-ой опытных группах происходит достоверное ($P \leq 0,05$; $P \leq 0,01$) увеличение титров противовирусных антител, значения которого находились на уровне 5,0 $\log_2$. Уровень антивирусных антител при введении аттенуированного штамма вируса ИРТ достоверно ($P \leq 0,01$) увеличивается в 3-ей опытной группе до значения 5,67 $\log_2$, что на 0,34 $\log_2$ выше в сравнении с опытной группой № 4, в которой указанный штамм вводился совместно с рекомбинантным Лф.

Титры противовирусных и антимикробных антител в крови морских свинок под действием рекомбинантного лактоферрина

Группа животных	Образец препарата	Титр антител, $\log_2$	
		До введения	Через 28 суток
1	2	3	4
Опытная группа № 1	ВД	1,0±0	5,0±0,58*
Опытная группа № 2	ВД +Лф	1,33±0,33	5,0±0**
Опытная группа № 3	ИРТ	1,67±0,33	5,67±0,33**
Опытная группа № 4	ИРТ+Лф	1,0±0	5,33±0,33**
Опытная группа № 5	ТГС	1,67±0,33	9,33±0,17***

Продолжение таблицы

1	2	3	4
Опытная группа № 6	ТГС+Лф	1,33±0,33	9,11±1,24*
Опытная группа № 7	РВ	1,0±0	6,0±0,58**
Опытная группа № 8	РВ+Лф	1,0±0	6,67±0,33***
Опытная группа № 9	*E.coli* А20	0	5,67±0,33***
Опытная группа № 10	*E.coli* А20+Лф	0	8,0±0***
Контрольная группа	ВД	1,0±0	2,0±0,58
	ИРТ	1,33±0,33	1,67±0,33
	ТГС	1,67±0,33	1,67±0,33
	РВ	1,0±0	1,33±0,33
	E.coli А20	0	0

Примечание: * – $P \leq 0,05$; ** – $P \leq 0,01$; *** – $P \leq 0,001$.

При введении лабораторным животным ротавируса свиней содержание специфических антител в сыворотке крови морских свинок при использовании рекомбинантного Лф превышало показатели животных без применения препарата на 0,67 $\log_2$ на фоне их значимого увеличения ($P \leq 0,01$; $P \leq 0,001$) в опытных группах 7 и 8.

При исследовании сывороток крови на противовирусные антитела к вирусу ТГС в РН их уровень при введении Лф совместно с вирусом был на 0,22 $\log_2$ ниже в сравнении с опытной группой № 5, которой вводился аттенуированный вирус.

Из представленных данных следует, что введение Лф не оказывает выраженного положительного влияния на продукцию противовирусных антител, так как уровень специфических антител в крови животных опытных групп, которым вводили Лф с вирусом, практически не отличался от морских свинок иммунизированных аттенуированными вирусами.

В сравнении с противовирусными антителами установлено повышение продукции антибактериальных антител под действием испытуемого препарата. Так, содержание противомикробных антител при совместном использовании *E.coli* А20 и Лф было на 2,33 $\log_2$ выше, чем у животных, получавших антиген *E.coli* без препарата.

Этот факт объясняется тем, что препарат рекомбинантного Лф при внутримышечной иммунизации может стимулировать фагоцитоз корпускулярного антигена, способствуя тем самым более пол-

ной и эффективной его презентации иммунной системе макроорганизма.

Механизм данного явления основан на взаимодействии Лф с липополисахаридом (ЛПС) *E.coli* через липид А, которое приводит к активации иммунных клеток (3, 4), так как в молекуле Лф было обнаружено 2 центра связывания ЛПС *E.coli*, которые локализованы в разных долях белка и имеют различные константы диссоциации 3,6нМ и 390нМ для N- и С-долей, соответственно (6).

Заключение. Полученные данные свидетельствуют об отсутствии стимулирующего действия рекомбинантного лактоферрина на выработку противовирусных антител к вирусам диареи, инфекционного ринотрахеита, трансмиссивного гастроэнтерита и ротавируса свиней в организме иммунизированных морских свинок. В то же время установлено повышение продукции антибактериальных антител к *Escherichia coli* А20 у морских свинок под действием лактоферрина за счет связывания с ЛПС бактериальных клеток и стимуляцией фагоцитоза корпускулярного антигена, уровень которых на 2,33 $\log_2$ был выше по сравнению с титрами, полученными при иммунизации лабораторных животных *E. coli* без препарата.

Литература

1. Староверов С.А. и др. Изучение влияния протеолитических компонентов лактоферрина на иммунную систему лабораторных животных: мат. Межд. научн.-практ.конф. «Ветеринарная медицина XXI века. Инновации, обмен опытом и перспективы развития». - Саратовский ГАУ. – Саратов, 2012. – С. 298-300.

2. Шейко И.П., Будевич А.И. Трансгенные биотехнологии: перспективы развития и использования в животноводстве: сб. науч. тр. «Зоотехническая наука Беларуси». - Жодино, 2006. – Т. 41. - С. 3-9.

3. Brandenburg K. et al. Biophysical characterization of lipopolysaccharide and lipid A inactivation by lactoferrin // Biol. Chem. – 2001. – Vol. 382. – P. 1215-1225.

4. Appelmelk B.J. et al. Lactoferrin is a lipid A-binding protein //Infect. Immun. – 1994. – Vol. 62. – P. 2628-2632.

5. Legrand D. et al. Lactoferrin: a modulator of immune and inflammatory responses //Cell Mol. Life Sci. –2005. – Vol. 62, № 22. – P. 2549-2559.

6. Elass-Rochard E. et al. Lactoferrin-lipopolysaccharide interaction: involvement of the 28-34 loop region of human lactoferrin in the high-affinity binding to E. coli 055B5 lipopolysaccharide //Biochem. J. – 1995. – Vol. 312. – P. 839-845.

7. Puddu P., Valenti P., Gessani S. Immunomodulatory effects of lactoferrin on antigen presenting cells //Biochimie. – 2009. – Vol. 91, № 1. – P. 11-18.

8. Ward P.P., Conneely O.M., Paz E. Multifunctional roles of lactoferrin: a critical overview //Cell Mol. Life Sci. – 2005. – Vol. 62, № 22. – P. 2540-2548.