

Литература

1. Анненков Г.А., Варламов В.П., Останина Е.С., Пузанов В.А., Клепиков Н.Н. // «Липазная концепция» лечения туберкулеза человека. Материалы Международной научно-практической конференции "Разработка противотуберкулезных терапевтических агентов нового поколения. Проблемы, подходы, перспективы" – М.; ХИМРАР, 2006. с. 10.
2. Герасименко Д.В., Авдиенко И.Д., Банникова Г.Е., Зуева О.Ю., Варламов В.П. Антибактериальная активность водорастворимых низкомолекулярных хитозанов в отношении различных микроорганизмов // Прикл. биохимия и микробиология, 2004. Т. 40. № 3.-С.301-306.

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ИММУНОЛОГИЧЕСКАЯ ЭФФЕКТИВНОСТЬ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ЛИПОПОЛИСАХАРИДОВ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ СПОСОБОВ ВЫДЕЛЕНИЯ

П.А.Красочко, В.А. Машеро, Е.А. Капитонова

РНИУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышеселского НАН Республики Беларусь», Минск;

Витебская государственная академия ветеринарной медицины,
Витебск, Республика Беларусь

В последние годы вопросу изучения бактериальных липополисахаридов (ЛПС) исследователями уделяется большое внимание. Это обусловлено тем, что они являются поликлональными активаторами В-системы лимфоцитов, т.е. происходит активизация этой субпопуляции как *in vivo*, так и *in vitro*. Даже незначительные дозы ЛПС позволяют активизировать биосинтез антител, повышать функциональную активность лимфоцитов. Часто бактериальные ЛПС используются с целью повышения резистентности или стимуляции поствакцинального иммунитета у животных. Кроме того, бактериальные ЛПС часто используются для оценки состояния В-системы лимфоцитов в системе *in vitro* в реакции бласттрансформации лимфоцитов. Однако при выделении ЛПС из условно-патогенных бактерий - сальмонелл, кишечной палочки, синегнойной палочки, шигелл, после обработки животных часто отмечаются осложнения - отек легких, тахикардия, угнетение общего состояния.

Снижение реактогенности бактериальных ЛПС для животных достигается путем использования в качестве их источника бактерий, непатогенных для

теплокровных животных. Такими бактериями могут служить бактерии, выделяемые из насекомых, в частности - возбудители заболеваний пчел.

Целью настоящего исследования явилось отработка оптимального способа выделения бактериального ЛПС из возбудителя европейского гнильца пчел - *Vas. alvei* и оценка иммунологической активности выделенных липополисахаридов.

Накопление бактериальной массы осуществляли на мясо-пептонном агаре путем культивирования при 37 °С в течение 2-х суток. Полученную бактериальную массу смывали стерильным изотоническим раствором натрия хлорида. Получение бактериальных ЛПС осуществляли с помощью гидролиза трихлоруксусной кислотой по Буавену-Месробиану, дистиллированной водой, уксусной кислотой, гидроокисью натрия, гидрокарбонатом натрия. Иммунологическую оценку бактериальных ЛПС, выделенных различными способами, проводили с помощью реакции бласттрансформации лимфоцитов (РБТЛ) по заключению H^3 тимидина при синтезе ДНК.

Для исследования использовали суспензию мононуклеаров крупного рогатого скота, которую получали путем центрифугирования в одноступенчатом градиенте плотности фикол-верографина (плотность 1,077), приготовленного на растворе Хенкса без добавления индикатора. Клеточную взвесь разбавляли средой 199, доводя плотность клеток до 1×10^6 кл/мл. Клетки инкубировали в микропланшетах для иммунологических проб в среде следующего состава: культуральная среда Игла с 1000 мл/л бикарбоната натрия, 100 ЕД/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина, 2 мкг/мл глутамина, 5% эмбриональной телячьей сыворотки. В полученную суспензию добавляли бактериальный ЛПС из *V. alvei*, полученные различными методами в концентрациях 10, 50, 100, 200, 400 мкг/мл, а для сравнения в качестве контроля - ЛПС *E. coli* в концентрации 10, 50, 100, 200 мкг/мл, ЛПС из *V. prodigiosum* в концентрациях 10, 50, 100 мкг/мл. За 4 часа до окончания 72-часовой инкубации культур лейкоцитов, проводимой при 37°С, в среду добавляли 3H -тимидин молярной активности 15 Ки/мл по 0,5 мкг/лунку. После окончания инкубации клетки осаждали на мем-

бренные фильтры "Sinpro", промывали холодным раствором трихлоруксусной кислоты с добавлением тимидина в 100-кратном избытке по отношению к радиоактивному, фиксировали в этаноле и освобождали от остатков воды в смеси этанол -эфир. Радиоактивность кислоторастворимого остатка определяли на сцинтилляционном счетчике Бета-1. Отношение числа импульсов в 1 мин в пробе с митогеном к таковому в контроле без митогена принимали за индекс стимуляции.

В результаты проведенных исследований установлено, что при использовании 5,0 г сырой бактериальной массы *Vac.alvei* получено ЛПС: с помощью трихлоруксусной кислоты - 29 мг конечного продукта, уксусной кислоты - 125 мг, гидроокиси натрия - 520 мг, гидрокарбоната натрия - 260 мг. Однако иммунологическая оценка полученных препаратов при постановке РБТЛ оказалась различной.

Индекс стимуляции при использовании бактериального ЛПС, полученного при помощи трихлоруксусной кислоты в концентрации 10 мкг/мл был $2,3 \pm 0,08$; 50 мкг/мл - $4,44 \pm 0,14$; 100 мкг/мл - $1,59 \pm 0,14$; 200 мкг/мл - $1,31 \pm 0,07$; 400 мкг/мл - $1,08 \pm 0,11$.

Индекс стимуляции ЛПС, полученного с помощью уксусной кислоты составлял: 10 мкг/мл - $2,49 \pm 0,08$; 50 мкг/мл - $1,69 \pm 0,58$; 100 мкг/мл - $4,46 \pm 0,07$; 200 мкг/мл - $2,45 \pm 0,04$; 400 мкг/мл - $1,25 \pm 0,11$.

Активность ЛПС, полученного с помощью гидроокиси натрия была: 10 мкг/мл - $2,41 \pm 0,09$; 50 мкг/мл - $3,78 \pm 0,88$; 100 мкг/мл ; $4,22 \pm 0,13$; 200 мкг/мл - $2,01 \pm 0,07$; 400 мкг/мл - $1,35 \pm 0,19$.

ЛПС, полученный с помощью гидрокарбоната натрия активизировал лимфоциты следующим образом: 10 мкг/мл - $1,50 \pm 0,09$; 50 мкг/мл - $1,79 \pm 0,06$; 100 мкг/мл - $2,29 \pm 0,08$; 200 мкг/мл - $1,33 \pm 0,03$; 400 мкг/мл - $1,17 \pm 0,04$.

При постановке РБТЛ с контрольными митогенами установлено, что индекс стимуляции с ЛПС из *E.coli* при концентрации 40 мкг/мл $4,7 \pm 0,75$; 50 мкг/мл - $9,31 \pm 0,96$; 100 мкг/мл - $10,36 \pm 0,86$; 200 мкг/мл - $3,01 \pm 4,03$. ЛПС из *Vact. prodigiosum* имел следующую активность: при концентрации 40 мкг/мл

3,08±0,83; 50 мкг/мл - 16,31±4,76; 100 мкг/мл - 21,52±3,6; 200 мкг/мл - 4,31±0,05.

В результате проведенных исследований установлено, что наибольший выход бактериального ЛПС получен при использовании щелочного гидролиза гидроксида натрия, а наименьший выход - при кислотном гидролизе трихлоруксусной кислотой, но иммунологическая активность у изучаемых ЛПС была более высокой при получении с помощью уксусной кислоты. Однако конечный выход липополисахарида, получаемого с помощью уксусной кислоты в 4 раза меньше, чем при использовании гидроксида натрия, хотя иммунологическая активность полученных препаратов была практически одинакова.

Таким образом, оптимальным методом для получения бактериального ЛПС из *Bac.alvei* является метод щелочного гидролиза гидроокисью натрия.

УСОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ИЗГОТОВЛЕНИЯ СЫВОРОТКИ ПРОТИВ РОЖИ СВИНЕЙ

Е.Э.Школьников, Г.Ф.Коломнина, А.Я.Самуйленко, Е.В.Исаев

Всероссийский научно-исследовательский и технологический институт биологической промышленности, Щелково, Московской обл.

Несмотря на широкое применение химиотерапевтических средств и вакцинных препаратов для лечения и профилактики заболевания рожи свиней гипериммунная сыворотка не утратила свое значение в качестве средства профилактики и терапии в борьбе с этой болезнью.

В настоящее время в качестве продуцентов для производства гипериммунной сыворотки против рожи свиней используются свиньи, срок эксплуатации которых невелик и составляет 5-6 месяцев (в зависимости от длины хвоста и клинического состояния продуцентов). Кроме того, процесс иммунизации и кровозятий у этого вида животных крайне трудоемок. Напротив, срок эксплуатации волов в качестве продуцентов сыворотки составляет не менее 5 лет.