

ИЗУЧЕНИЕ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ ИММУНОКОМПЕТЕНТНЫХ КЛЕТОК КРОВИ ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ ПРИ ПРИМЕНЕНИИ ИММУНОСТИМУЛИРУЮЩЕГО ПРЕПАРАТА ИЗ БАЦИЛЛ

Красочко П.А., доктор ветеринарных наук, доктор биологических наук, профессор УО «Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины», г. Витебск, Республика Беларусь

Красочко И.А., доктор ветеринарных наук, профессор УО «Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины», г. Витебск, Республика Беларусь

Дуж Е.В., кандидат биологических наук, ГНУ «Институте биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси», г. Минск, Республика Беларусь

Попова П.Ю., преподаватель ФГБОУ ВО «Смоленская государственная сельскохозяйственная академия», г. Смоленск, Россия

***Аннотация.** Целью настоящих исследований - изучение функциональной активности иммунокомпетентных клеток крови лабораторных животных при применении иммуностимулирующего препарата из бацилл. При изучении влияния иммуностимулятора на основе липополисахарида *Bac. subtilis* на функциональную активность фагоцитов показало, что коэффициент стимуляции при сокультивировании с НГ достоверно не изменяется и составляет 1,10, при этом и кислородзависимый метаболизм клеток сохраняется, а с коммерческим иммуностимулятором «Альвеозан» происходит уменьшение коэффициент стимуляции более чем на 10%, что объясняется более быстрым истощением резервных возможностей иммунокомпетентных клеток.*

***Ключевые слова:** бациллы, функциональная активность, иммуностимуляция, клетки крови, липополисахариды бацилл.*

Введение. Число сообщений об изучении различных липополисахаридов, трудно обозримо уже сейчас, продолжает стремительно нарастать. Особенно интенсивно изучаются липополисахариды как грамнегативных, так и грампозитивных бактерий, в оболочке которых содержится до 15 – 40% ЛПС. Это обусловлено тем, что они являются поликлональными активаторами В - системы лимфоцитов.

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 [2, 3].

Из имеющихся в арсенале иммуностимулирующих препаратов, бактериальные липополисахариды являются одними из наиболее действенных. В клинической иммунологии широкое применение получили такие препараты, как продигиозан из *Bact. prodigiosus*, пирогенал из *Ps. aeruginosa*, сальмозан из бактерий группы *Salmonella* и др. Дозировка в 1-2 мкг/кг живой массы животных при применении животным парэнтерально вызывает очень сильную ответную реакцию, сопровождается отеком легких, тахикардией, общим угнетением, зачастую заканчивается летальным исходом. Такое положение обусловлено тем, что бактериальные липополисахариды (продигиозан, пирогенал, сальмозан) получены из условно-патогенных микроорганизмов животных и даже за небольшой период постнатального развития иммунная система сенсibilизирована антигенами этих бактерий. Поэтому на введение даже небольшой дозы липополисахарида организм отвечает реакцией гиперчувствительности немедленного типа, то есть анафилактическим шоком [1, 4].

Для снижения реактогенности бактериальных липополисахаридов и повышения эффективности лечебно-профилактических мероприятий при различных заболеваниях животных поиск был направлен на получение липополисахарида из бактерий, не имеющих контакта с организмом теплокровных животных и непатогенными для них. Из имеющегося в арсенале исходного материала выбор был остановлен на спорообразующих аэробных микроорганизмах – бациллах, имеющих ряд достоинств перед другими бактериями. Во-первых, данные микроорганизмы имеют очень высокую энергию роста; во-вторых, очень сильную ферментную систему; в-третьих, являются источниками биологически активных веществ; в-четвертых, почвенные сапрофиты непатогенные для теплокровных животных и т.д. [2,3]

Бактериальные липополисахариды нашли использование для неспецифической профилактики и терапии респираторных заболеваний, однако широкого распространения не получили из-за их высокой реактогенности.

Целью настоящих исследований явилось изучение функциональной активности иммунокомпетентных клеток крови лабораторных животных при применении иммуностимулирующего препарата из бацилл

Материалы и методы.

Исследования проводились в условиях кафедры биотехнологии и ветеринарной медицины ФГБОУ ВО «Смоленская государственная сельскохозяйственная академия», отделе вирусных инфекций РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н.Вышелесского», лаборатории иммунологии и вирусологии ГНУ «Институт биофизики и клеточной инженерии».

Изучение влияния иммуностимулирующего препарата на основе бактериальных липополисахаридов из бацилл на функциональную активность лимфоцитов проводили с помощью НСТ-теста, который основан на том, что активация клеток сопровождается кислород-зависимым метаболическим "взрывом", образующиеся при этом супероксидные радикалы восстанавливают нитросиний тетразолий в нерастворимые окрашенные зерна формазана, количество которых служит критерием интенсивности реакции.

Применяли спектрофотометрический вариант теста, заключающийся в растворении зерен формазана ацетоном и измерении поглощения в двухволновом режиме: 490/540 нм интактных и активированных иммуностимуляторами клеток (препаратом «Альвеозан» и испытуемым новым иммуностимулятором).

В модельных экспериментах изучено действие иммуностимуляторов на функциональную активность лимфоцитов крови морских свинок. Лимфоциты из крови морских свинок выделяли стандартным способом центрифугирования в градиенте плотности фиколл-урографина. Эксперименты проводили на клетках непосредственно после их выделения и после инкубации клеток в стандартных условиях CO₂-инкубатора в течение 24 часов (5% CO₂, 75% влажности, 37⁰C).

Функциональную активность нейтрофильных гранулоцитов (макрофагов) периферической крови оценивали по способности поглощать индифферентные частицы туши. В качестве показателей, характеризующих поглотительную способность фагоцитов, определяли фагоцитарный показатель – процент фагоцитирующих клеток от общего числа просмотренных нейтрофилов и фагоцитарное число – среднее количество частиц туши, поглощенных одним активным нейтрофилом.

В модельных экспериментах изучено действие нового иммуностимулятора на функциональную активность нейтрофильных гранулоцитов крови морских свинок. Мононуклеары из венозной крови морских свинок выделяли стандартным способом центрифугирования в градиенте плотности фиколл-урографина. Нейтрофильные гранулоциты ресуспендировали в питательной среде Игла с добавлением в нее гентамицина.

К свежевыделенным нейтрофильным гранулоцитам ($3,5 \times 10^5$ клеток на чашку Петри) добавляли 3 мл свежей среды Игла (без антибиотика), 50 мкл индифферентных частиц туши (1/200) и иммуностимуляторы. После инкубации в течение 45 мин при 37⁰C чашку промывали, клетки фиксировали метанолом, окрашивали по Романовскому-Гимза и микроскопировали с применением иммерсионного объектива. Оценивали фагоцитарный показатель - процент фагоцитирующих клеток от общего числа макрофагов и фагоцитарное число - среднее количество частиц туши, поглощенных одним активным макрофагом.

Изучение влияния иммуностимулятора на функциональную активность фагоцитов проводили на нейтрофильных гранулоцитах (НГ), выделенных из периферической крови морских свинок. Функциональную активность НГ оценивали по способности к активации кислородзависимого метаболизма по тесту восстановления нитротетразолиевого синего (НСТ-тест). НСТ-тест

фиксирует интенсивность «респираторного» взрыва, являясь чувствительным индикатором раздражения клеток (спонтанный НСТ-тест) и их функциональных резервов (индуцированный НСТ-тест). В качестве индуктора использовали иммуностимулятор из бацилл, так как его действие аналогично зимозану, и для сравнения коммерческий препарат «Альвеозан». Резервы функциональной активности НГ оценивали по коэффициенту стимуляции $K_{ст}$ (отношении оптической плотности индуцированных клеток к этому же параметру в интактных).

Результаты исследований. Установлено, что у свежевыделенных лимфоцитов крови в присутствии нового иммуностимулятора на основе липополисахарида *Bac. subtilis* кислородзависимый метаболизм растет от 23 до 53% для разных животных, а в присутствии коммерческого препарата «Альвеозан» – от 11 до 45%. При сравнении функциональной активности лимфоцитов под влиянием иммуностимуляторов после инкубации клеток в CO₂-инкубаторе в течение 24 часов обнаружено, что наблюдается снижение кислородзависимого метаболизма как спонтанного, так и индуцированного, при этом новый иммуностимулятор стимулирует клетки от 10 до 27% у разных животных, а «Альвеозан» - на 5-10%.

В результате проведенных экспериментов можно заключить, что как коммерческий препарат «Альвеозан», так и новый иммуностимулятор повышают функциональную активность лимфоцитов животных по способности к стимуляции кислородзависимого метаболизма в НСТ-тесте, причем эффекты нового иммуностимулятора более выражены ($28,25 \pm 9,01\%$ против $17,75 \pm 9,18\%$).

Функциональную активность нейтрофильных гранулоцитов (макрофагов) периферической крови оценивали по способности поглощать индифферентные частицы туши.

В модельных экспериментах изучено действие нового иммуностимулятора на основе липополисахарида *Bac. subtilis* на функциональную активность нейтрофильных гранулоцитов крови морских свинок. Установлено, что если у свежевыделенных нейтрофильных гранулоцитов крови фагоцитарный показатель составляет в среднем $15 \pm 5\%$, то в присутствии иммуновета фагоцитарная активность растет в среднем до $72,5 \pm 11\%$ для разных животных, а в присутствии коммерческого препарата «Альвеозан» – в среднем до $68 \pm 12\%$. При сравнении функциональной активности нейтрофилов по параметру фагоцитарное число обнаружено, что в контрольных клетках наблюдаются единичные захваты частиц туши, тогда как под влиянием вышеуказанных иммуностимуляторов это число значительно растет: при этом обработка препаратом «Имуновет» стимулирует активированные клетки до захвата в среднем до 85 индифферентных частиц, а альвеозаном - до 52.

Таким образом, в результате проведенных экспериментов можно заключить, что как коммерческий препарат «Альвеозан», так и созданный в РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского» иммуностимулятор на основе липополисахарида *Bac. subtilis* повышают

функциональную активность фагоцитов периферической крови лабораторных животных по параметрам фагоцитарный показатель и фагоцитарное число, причем новый иммуностимулирующий препарат проявляет более высокую эффективность.

Изучение влияния нового иммуностимулятора на функциональную активность фагоцитов проводили на нейтрофильных гранулоцитах (НГ), выделенных из периферической крови морских свинок.

Ранее нами было установлено, что внесение в клеточную суспензию иммуностимулятора на основе липополисахарида *Bac. subtilis* вызывает повышение коэффициента стимуляции НГ на 16,7-17,9 %, а «Альвеозана» на 19,48% по сравнению с контролем, где изучаемый препарат отсутствует (**Кст**=1,042). Кроме того, было проведено дополнительное сокультивирование НГ с новым иммуностимулятором на основе липополисахарида *Bac. subtilis* в течение 30 мин. Оказалось, что достоверно **Кст** не изменяется и составляет 1,101, при этом и кислородзависимый метаболизм клеток сохраняется, а с коммерческим иммуностимулятором «Альвеозан» происходит уменьшение **Кст** более чем на 10%.

На данном этапе работы было исследовано влияние иммуностимуляторов на функциональное состояние первичной культуры НГ (сокультивирование в течение 24 часов). Установлено, что как в присутствии коммерческого препарата «Альвеозан», так и препарата на основе липополисахарида *Bac. subtilis* наблюдается уменьшение **Кст** НГ на 15,5-17,8 % по сравнению со свежеприготовленными НГ, что объясняется истощением резервных возможностей клеток.

Вызывал интерес вопрос, как изучаемые иммуностимуляторы будут действовать на НГ при одновременном их присутствии в клеточной суспензии. Оказалось, что внесение в клеточную суспензию свежевыделенных НГ иммуностимуляторов иммуновета и альвеозана приводит к незначительному увеличению функциональной активности клеток на 7,0%, по сравнению с контролем. Если сравнивать с ранее полученными результатами, то можно предположить, что происходит первичное ингибирование двух иммуностимуляторов друг другом. Иная картина наблюдается в первичной культуре НГ (через 24 часа): если наличие как альвеозана, так и иммуностимулятора на основе липополисахарида *Bac. subtilis* вызывает уменьшение **Кст** НГ на 15,5-17,8 % за счет подавления кислородзависимого метаболизма НГ в индуцированном НСТ-тесте, то их совместное культивирование не изменяет **Кст**, то есть резервные силы клеток через 24 часа поддерживаются на прежнем уровне.

Таким образом, изучение влияния иммуностимулятора на основе липополисахарида *Bac. subtilis* на функциональную активность фагоцитов показало, что коэффициент стимуляции при сокультивировании с НГ достоверно не изменяется и составляет 1,10, при этом и кислородзависимый метаболизм клеток сохраняется, а с коммерческим иммуностимулятором «Альвеозан» происходит уменьшение коэффициент стимуляции более чем на

10%, что объясняется более быстрым истощением резервных возможностей иммунокомпетентных клеток.

Список литературы:

1. Микробиология и иммунология: учебное пособие В 2 ч. Ч.1. Общая микробиология и иммунология / А.А.Солонко [и др.] - Издательство «Пион». Минск, 2002. 248 с.
2. Методические рекомендации по использованию бактериальных липополисахаридов для стимуляции иммунной системы животных /П.А.Красочко [и др.] - УП «Арти-Фекс», Минск, 2013. 40 с.
3. Общие вопросы иммунологии и возникновения иммунодефицитов: монография / П. А. Красочко [и др.] - Краснодар: КубГАУ, 2021. 435 с.
4. Прикладные аспекты иммуномодуляции с использованием средств природного происхождения/ П. А. Красочко [и др.] - Краснодар: КубГАУ, 2021. 398 с.
5. Оценка биологической активности липополисахаридов *Bacillus subtilis* по экспрессии поверхностных маркеров иммунокомпетентных клеток/ П.А. Красочко [и др.]// Ветеринарный журнал Беларуси. 2023. № 1 (18). С. 108-112
6. Определение оптимальной иммунизирующей дозы поливалентной вирус-вакцины против вирусных пневмоэнтеритов "БОЛЬШЕВАК" /П.А. Красочко, М.А. Понаськов, Л.С. Кашко, И.М. Кугелев //В сборнике: Тенденции повышения конкурентноспособности и экспортного потенциала продукции агропромышленного комплекса. 2021. С. 121-130.
7. Кашко Л.С., Малашин К.А. Проектирование и разработка дополнительных профессиональных программ в области ветеринарной медицины в условиях ФГБОУ ВО СМОЛЕНСКАЯ ГСХА // В сборнике: СОВРЕМЕННЫЕ ЭКОЛОГИЧЕСКИ УСТОЙЧИВЫЕ ТЕХНОЛОГИИ И СИСТЕМЫ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННОГО ПРОИЗВОДСТВА. сборник материалов международной научной конференции. Смоленск, 2021. С. 199-203.
8. Бычкова Т.К. Использование биологических особенностей животных - один из путей органического животноводства // В сборнике: Устойчивое развитие агропромышленного комплекса как основа продовольственной безопасности. СБОРНИК МАТЕРИАЛОВ II МЕЖДУНАРОДНОЙ НАУЧНОЙ КОНФЕРЕНЦИИ. Смоленск, 2024. С. 96-99.