

Иван Николаевич Кошкин

Омский государственный аграрный университет им. П.А. Столыпина, аспирант кафедры ветеринарной микробиологии, инфекционных и инвазионных болезней, Омск, Россия

E-mail: in.koshkin36.06.01@omgau.org

Василий Сергеевич Власенко

Омский аграрный научный центр, главный научный сотрудник отдела ветеринарии, доктор биологических наук, доцент, Омск, Россия

E-mail: vvs-76@list.ru

Михаил Аристоклеви́ч Бажин

Омский государственный аграрный университет им. П.А. Столыпина, профессор кафедры ветеринарной микробиологии, инфекционных и инвазионных болезней, доктор ветеринарных наук, профессор, Омск, Россия

E-mail: vetmik.kaf@omgau.org

ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ НЕЙТРОФИЛОВ У МОРСКИХ СВИНОК, ИММУНИЗИРОВАННЫХ КОНЪЮГАТАМИ НА ОСНОВЕ АНТИГЕНОВ БЦЖ С БЕТУЛИНОМ И ЕГО ПРОИЗВОДНЫМИ

*Цель исследования – изучение активности кислороднезависимых и кислородзависимых бактерицидных систем нейтрофилов у животных, инфицированных *Mycobacterium bovis*, на фоне предварительной сенсбилизации организма конъюгатами на основе антигенов БЦЖ с адъювантами растительного происхождения. Проведен эксперимент на 55 морских свинок, разделенных на 11 групп по 5 голов в каждой. Особям 1–3-й групп был подкожно введен антигенный комплекс БЦЖ, конъюгированный с бетулином, соответственно в дозах 0,5; 1,0 и 1,5 мг/мл белка; 4–6-й групп – по аналогичной схеме препарат с бетулиновой кислотой и 7–9-й групп – конъюгат с бетулиновой кислотой в тех же дозах; 10-ю группу составили животные, привитые вакциной БЦЖ внутривенно в дозе 0,1 мг, и 11-ю группу – интактные морские свинки (контроль). В результате исследования установлено, что с повышением концентрации корпускулярных адъювантов в экспериментальном конъюгате происходит снижение активности кислороднезависимых (лизосомальные катионные белки) и кислородзависимых (миелопероксидаза) бактерицидных систем лейкоцитов. Наиболее выраженное увеличение содержания катионных белков и миелопероксидазы на 30-е сут после введения вирулентной культуры микобактерий (помимо животных, привитых БЦЖ) наблюдалось у морских свинок, иммунизированных препаратами, содержащими бетулиновую кислоту в дозах 1,0 и 0,5 мг/мл. У особей этих же опытных групп при патолого-анатомическом исследовании была зафиксирована самая низкая степень пораженности внутренних органов. Полученные результаты указывают на перспективность использования производных бетулина в качестве адъювантов вакцинных препаратов.*

Ключевые слова: морские свинки, туберкулез, вакцина БЦЖ, конъюгаты, бетулин, адъювант, нейтрофил, катионные белки, миелопероксидаза.

Ivan N. Koshkin

Omsk State Agrarian University after P.A. Stolypin, graduate student of the Department of Veterinary Microbiology, Infectious and Invasive Diseases, Omsk, Russia

E-mail: in.koshkin36.06.01@omgau.org

Vasily S. Vlasenko

Omsk Agrarian Research Center, Chief Researcher, Veterinary Department, Doctor of Biological Sciences, Associate Professor, Omsk, Russia

E-mail: vvs-76@list.ru

Mikhail. A. Bazhin

Omsk State Agrarian University after P.A. Stolypin, Professor, Department of Veterinary Microbiology, Infectious and Invasive Diseases, Doctor of Veterinary Sciences, Professor, Omsk, Russia
E-mail: vetmik.kaf@omgau.org

FUNCTIONAL ACTIVITY OF NEUTROPHILS IN GUINEA PIGS, IMMUNIZED WITH CONJUGATES, BASED ON BCG ANTIGENS WITH BETULIN AND ITS DERIVATIVES

*The aim of research was to study the activity of oxygen-independent and oxygen-dependent bactericidal systems of neutrophils in animals infected with *Mycobacterium bovis* against the background of preliminary sensitization of the body with conjugates based on BCG antigens with adjuvants of plant origin. An experiment was carried out on 55 guinea pigs, divided into 11 groups of 5 heads each. Individuals of groups 1–3 were injected subcutaneously with the BCG antigenic complex conjugated with betulin, respectively, in doses of 0.5; 1.0 and 1.5 mg/ml protein; groups 4–6 – preparation with betulinic acid according to a similar scheme, a drug with betulinic acid and groups 7–9 – a conjugate with betulonic acid in the same doses; the 10th group consisted of animals vaccinated with BCG vaccine intradermally at a dose of 0.1 mg, and the 11th group - intact guinea pigs (control). As a result of the study, it was found that with an increase in the concentration of corpuscular adjuvants in the experimental conjugate, the activity of oxygen-independent (lysosomal cationic proteins) and oxygen-dependent (myeloperoxidase) bactericidal systems of leukocytes decreases. The most pronounced increase in the content of cationic proteins and myeloperoxidase on the 30th day after the introduction of a virulent culture of mycobacteria (in addition to animals vaccinated with BCG) was observed in guinea pigs immunized with preparations containing betulinic acid at doses of 1.0 and 0.5 mg/ml. In individuals of the same experimental groups, the lowest degree of damage to the internal organs was recorded during the pathological and anatomical examination. The results obtained indicate that the use of betulin derivatives as adjuvants for vaccine preparations is promising.*

Keywords: guinea pigs, tuberculosis, BCG vaccine, conjugates, betulin, adjuvant, neutrophil, cationic proteins, myeloperoxidase.

Введение. Вакцинация *Bacillus Calmette-Guerin* (БЦЖ) стала крупным достижением в области профилактики туберкулеза у людей в начале прошлого века, но, несмотря на почти столетнее использование вакцины, ее применение на животных ограничено главным образом по причине поствакцинальных реакций, затрудняющих диагностику заболевания [1, 2].

Одной из перспективных концепций, позволяющей конструировать экологически безопасные молекулярные препараты, позитивно воздействующие на систему иммунитета и не осложняющие контроль за туберкулезной инфекцией в стадах, является конъюгация антигенов, выделенных из вакцинного штамма БЦЖ, с иммуностимулирующей матрицей [3, 4].

Сконструированные по указанному принципу специфические иммуномодуляторы, как показали проведенные исследования, требуют дальнейшего совершенствования, одним из наиболее возможных путей которого являются поиск

новых средств с адъювантными свойствами и замена стимулирующей матрицы более эффективными. Весьма перспективным объектом в этом плане является бетулин, содержащийся в верхней, белой части коры березы, а также его производные (бетулиновая и бетулоновая кислоты), обладающие разнообразной биологической активностью, в т. ч. адъювантной [5, 6].

Наиболее ранним звеном воспалительного процесса, индуцированного *M. bovis*, является реакция фагоцитирующих клеток, осуществляемая с помощью двух различных механизмов. Один из них происходит в анаэробных условиях при участии катионных белков, другой – кислородзависимый, реализующийся посредством кислородного взрыва, в процессе которого появляются активные формы кислорода (перекись водорода, гипохлорит-анион, образуемый ферментом лизосом нейтрофилов – миелопероксидазой, и др.) [7].

С этой точки зрения представляется перспективным изучение функциональной активности нейтрофилов, вовлеченных в формирование иммунного ответа у морских свинок на введение экспериментальных конъюгатов на основе антигенов БЦЖ с бетулином и его производными и последующее инфицирование вирулентной культурой *M. bovis*.

Цель исследования: изучить активность кислороднезависимых и кислородзависимых бактерицидных систем нейтрофилов у животных, инфицированных *Mycobacterium bovis*, на фоне предварительной сенсibilизации организма конъюгатами на основе антигенов БЦЖ с бетулином и его производными.

Материалы и методы исследования. Антигенные комплексы получали из культуры вакцинного штамма БЦЖ, выращенной на жидкой синтетической среде Сотона, а затем дезинтегрированной ультразвуком на установке УЗДН-1 в течение 30 мин при частоте 22–35 кГц и мощности 60–70 Вт/см². Разрушенную суспензию центрифугировали и в надосадочной жидкости определяли содержание белка, концентрацию которого доводили до 1 мг/мл белка. Для иммунизации применяли конъюгаты, содержащие антигены БЦЖ в комплексе с корпускулярными адьювантами на основе бетулина, а также его производных: бетулиновой и бетулоновой кислот. Испытывали разные концентрации адьювантов: 0,5; 1,0 и 1,5 мг/мл белка.

Для проведения опыта отобрано 55 морских свинок, отрицательно реагирующих на введение ППД-туберкулина для млекопитающих, из которых сформировали 11 групп по 5 животных в каждой группе. Особям I–III группы подкожно ввели конъюгат на основе антигенов БЦЖ с бетулином в дозе 0,5 мл с содержанием адьюванта соответственно 0,5; 1,0 и 1,5 мг/мл белка; IV–VI группы – инъекцировали подкожно препарат, содержащий антигены БЦЖ в комплексе с бетулиновой кислотой, по идентичной схеме; VII–IX группы – препарат на основе антигенов БЦЖ с бетулоновой кислотой в тех же концентрациях; морским свинкам X группы – внутрикожно вакцину БЦЖ в дозе 0,1 мг в 0,1 мл физиологического раствора. Еще пять интактных особей (группа XI) служили контролем. На 30-е сут по-

сле сенсibilизации противотуберкулезными препаратами морские свинки всех групп были инфицированы вирулентной культурой *M. bovis* (штамм 14), подкожно в дозе 0,001 мг/мл, затем через 45 сут после экспериментального заражения были подвергнуты диагностическому убою для патолого-анатомических исследований. Оценивали показатель пораженности органов по методу С.И. Гельберг, Е.А. Финкель [8].

Отбор проб крови для оценки функционального состояния нейтрофилов, а также аллергические исследования ППД-туберкулином производили на 30-е сут после введения препаратов, а также на 30-е сут после экспериментального инфицирования.

Состояние кислородзависимого метаболизма нейтрофилов оценивали цитохимическим определением активности миелопероксидазы (МПО) по методу Грэхем-Кнолля с использованием бензидина [9]; кислороднезависимого – лизосомально-катионных белков (ЛКБ) по методу М.Г. Шубича с бромфеноловым синим [10]. При анализе мазков подсчитывали процент положительно прореагировавших клеток и в соответствии со стандартными методиками рассчитывали средний цитохимический коэффициент (СЦК).

Цифровой материал был подвергнут математической обработке с помощью программы MS Excel 2007 с определением средней арифметической (M) и ошибки средней арифметической ($m \pm$). Статистическую существенность различий оценивали по t-критерию Стьюдента.

Результаты исследования и их обсуждение. Анализ параметров функционального состояния нейтрофилов на 30-е сут после введения экспериментальных конъюгатов показал, что с увеличением в препарате концентрации всех изучаемых нами корпускулярных адьювантов происходит ослабление деятельности антибактериальных систем (табл. 1). Подобная траектория показателей также была характерна для морских свинок, привитых БЦЖ. Так, введение живой вакцины сопровождалось снижением активности неферментных и особенно ферментных систем нейтрофилов, о чем свидетельствовало достоверное уменьшение содержания миелопероксидазы до $0,45 \pm 0,06$ против $0,84 \pm 0,05$ ($p < 0,01$) в контрольной группе.

Содержание лизосомальных катионных белков и активность миелопероксидазы у морских свинок на 30-е сут после введения противотуберкулезных препаратов, М±m

Номер группы, препарат	Доза, мг/мл белка	ЛКБ	МПО
I (антигены БЦЖ, бетулин)	0,5	1,46*±0,16	1,15±0,16
II (антигены БЦЖ, бетулин)	1,0	1,42±0,25	1,08±0,17
III (антигены БЦЖ, бетулин)	1,5	0,52±0,05*	0,55±0,17
IV (антигены БЦЖ, бетулиновая кислота)	0,5	1,08±0,13	1,04±0,14
V (антигены БЦЖ, бетулиновая кислота)	1,0	0,68±0,11	0,57±0,06*
VI (антигены БЦЖ, бетулиновая кислота)	1,5	0,62±0,11	0,52±0,02**
VII (антигены БЦЖ, бетулоновая кислота)	0,5	1,10±0,13	0,99±0,15
VIII (антигены БЦЖ, бетулоновая кислота)	1,0	0,77±0,07	0,55±0,10
IX (антигены БЦЖ, бетулоновая кислота)	1,5	0,72±0,07	0,59±0,17
X (вакцина БЦЖ)	–	0,70±0,09	0,45±0,06**
XI (контроль)	–	0,92±0,06	0,84±0,05

*p < 0,05; **p < 0,01.

Изменения, свойственные особям, вакцинированным БЦЖ, были отмечены и у морских свинок III, V и VI групп, но с той разницей, что в III группе было зафиксировано наиболее выраженное снижение количества лизосомальных катионных белков (0,52±0,05, 0,92±0,06; p < 0,05), тогда как в V и VI группах – миелопероксидазы соответственно до 0,57±0,06 (p < 0,05) и 0,52±0,02 (p < 0,01) против 0,84±0,05 в контроле. Необходимо отметить, что введение конъюгатов на основе антигенов БЦЖ с бетулоновой кислотой в дозе от 1,0 мг/мл белка и выше также способствовало ослаблению функциональной активности бактерицидных систем нейтрофилов, однако не достигало статистически достоверной разницы.

При введении экспериментальных конъюгатов на основе антигенов БЦЖ с бетулином в

дозе 0,5–1,0 мг/мл белка, а также с его производными (бетулиновая и бетулоновая кислота) в дозе 0,5 мг/мл белка, напротив, отмечалась тенденция к усилению активности неферментных и ферментных систем нейтрофилов.

Необходимо отметить, что аллергическая реакция на введение ППД-туберкулина на 30-е сут после обработки противотуберкулезными препаратами развивалась только у морских свинок, привитых вакциной БЦЖ.

На 30-е сут после введения вирулентной культуры микобактерий у морских свинок всех опытных групп выявлены однонаправленные изменения, характеризующиеся усилением антибактериальной активности нейтрофилов относительно контроля (табл. 2).

Таблица 2

Содержание лизосомальных катионных белков и активность миелопероксидазы у морских свинок на 30-е сут после введения вирулентной культуры *M. bovis*, М±m

Номер группы, препарат	Доза, мг/мл белка	ЛКБ	МПО
1	2	3	4
I (антигены БЦЖ, бетулин)	0,5	1,12±0,03***	0,84±0,11
II (антигены БЦЖ, бетулин)	1,0	1,00±0,11**	0,74±0,13
III (антигены БЦЖ, бетулин)	1,5	0,95±0,09**	0,73±0,10
IV (антигены БЦЖ, бетулиновая кислота)	0,5	0,91±0,13*	0,69±0,14

Окончание табл. 2

1	2	3	4
V (антигены БЦЖ, бетулиновая кислота)	1,0	0,87±0,07**	0,78±0,03**
VI (антигены БЦЖ, бетулиновая кислота)	1,5	0,78±0,08**	0,68±0,10
VII (антигены БЦЖ, бетулоновая кислота)	0,5	1,03±0,04***	0,86±0,04**
VIII (антигены БЦЖ, бетулоновая кислота)	1,0	0,94±0,03***	0,73±0,05
IX (антигены БЦЖ, бетулоновая кислота)	1,5	0,90±0,08**	0,72±0,12
X (вакцина БЦЖ)	–	1,45±0,05***	1,12±0,09**
XI (контроль)	–	0,33±0,03	0,61±0,02

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Выраженная активизация как неферментных, так и ферментных систем отмечена только в V, VII и X группах. Так, у животных, привитых БЦЖ, зафиксировано увеличение содержания ЛКБ и активности МПО соответственно в 4,4 ($p < 0,001$) и 1,83 ($p < 0,01$) раза; у сенсibilизированных конъюгатом антигенов БЦЖ с бетулоновой кислотой в дозе 0,5 мг/мл – в 3,1 ($p < 0,001$) и 1,4 ($p < 0,01$) раза; у иммунизированных антигенным комплексом с бетулиновой кислотой в дозе 1,0 мг/мл – в 2,6 и 1,28 ($p < 0,01$) раза.

В остальных группах введение экспериментальных конъюгатов индуцировало достоверный рост активности кислороднезависимой бактерицидной системы (ЛКБ), тогда как повышение количества МПО, характеризующей кислородзависимый метаболизм нейтрофилов, не достигало достоверной разницы.

По результатам патолого-анатомических исследований установлено, что у морских свинок из групп с наиболее высокой активностью бактерицидных систем выявлена самая низкая степень пораженности органов. Так, среднегрупповые значения этого показателя у животных X группы составили 1,60±0,6 баллов, VII группы – 1,80±0,20 и V группы – 2,40±0,40 баллов, тогда как в контрольной группе – 6,60±0,40 балла.

Самая низкая способность противостоять экспериментальному заражению отмечена у особей, которым были введены препараты, содержащие наиболее высокие концентрации корпускулярных адъювантов.

Выводы. Конъюгаты на основе антигенов БЦЖ с бетулином в дозе 0,5–1,0 мг/мл, с бетулиновой и бетулоновой кислотами в дозах 0,5 мг/мл оказывают стимулирующее влияние на активность неферментных (катионные белки) и ферментных (миелопероксидаза) бактерицидных систем нейтрофилов. Увеличение концен-

трации корпускулярных адъювантов в препарате приводит к снижению деятельности указанных антибактериальных механизмов.

Введение вирулентной культуры микобактерий (шт. 14) морским свинкам, привитым БЦЖ, а также особям, сенсibilизированным конъюгатами на основе антигенов БЦЖ с бетулиновой кислотой в дозе 1,0 мг/мл и с бетулоновой кислотой в дозе 0,5 мг/мл, сопровождалось достоверным усилением как кислороднезависимой, так и кислородзависимой бактерицидных систем. По результатам патолого-анатомических исследований установлено, что эти препараты к тому же обеспечивали наиболее эффективную защиту животных.

Полученные результаты указывают на перспективность использования производных бетулина в качестве адъювантов иммунобиологических препаратов и необходимость дальнейшего изучения их свойств.

Литература

1. *Buddle B.M., Vordermeier H.M., Chambers M.A., de Klerk-Lorist L.M.* Efficacy and safety of BCG vaccine for control of tuberculosis in domestic livestock and wildlife // *Front. Vet. Sci.* 2018. Vol. 5. P. 259.
2. *Balseiro A., Thomas J., Gortazar C., Risdal M.A.* Development and challenges in animal tuberculosis vaccination // *Pathogens.* 2020. Vol. 9 (6). P. 472.
3. *Власенко В.С., Шулико Е.М., Петров С.Ю.* и др. Иммуностимулирующие свойства конъюгатов, изготовленных на основе антигенов БЦЖ с поливинилпирролидоном // *Достижения науки и техники АПК.* 2009. № 12. С. 47–50.

4. Власенко В.С., Гичев Ю.М., Дудолодова Т.С. и др. Гистопатоморфологические изменения внутренних органов морских свинок при введении противотуберкулезного препарата КИМ-М2 // Вестник КрасГАУ. 2019. № 8 (149). С. 97–102.
5. Красильников И.В., Николаева А.М., Машин В.В. Изучение возможности использования нанодисперсии экстракта бересты в качестве адъюванта вакцинных препаратов // Сибирский медицинский журнал. Томск, 2011. Т. 26, № 2-2. С. 65–67.
6. Amiri S., Ghavami S., Dastghaib S. et al. Betulin and its derivatives as novel compounds with different pharmacological effects // Biotechnology advances. 2020. Vol. 38. P. 107–409.
7. Circu M.L., Aw T.Y. Reactive oxygen species, cellular redox systems, and apoptosis // Free Radical Biol. Med. 2010. Vol. 48 (6). P. 749–762.
8. Гельберг С.И., Финкель Е.А. К методике экспериментального изучения иммуногенных свойств противотуберкулезных вакцин и эффективность методов их применения // Проблемы туберкулеза. 1959. № 2. С. 80–84.
9. Hrycek A. Functional characterization of peripheral blood neutrophils in patients with primary hypothyroidism // Folia Biol. (Praha). 1993. № 39 (6). S. 304–310.
10. Шубич М.Г. Выявление катионного белка в цитоплазме лейкоцитов с помощью бромфенолового синего // Цитология. 1974. Т. 16, № 10. С. 1321–1322.
2. Balseiro A., Thomas J., Gortazar C., Risalde M.A. Development and challenges in animal tuberculosis vaccination // Pathogens. 2020. Vol. 9 (6). P. 472.
3. Vlasenko V.S., Shuliko E.M., Petrov S.Yu. i dr. Immunostimuliruyuschie svojstva kon'yugatov, izgotovlennyh na osnove antigenov BCZh s polivinilpirrolidonom // Dostizheniya nauki i tehniki APK. 2009. № 12. S. 47–50.
4. Vlasenko V.S., Gichev Yu.M., Dudoladova T.S. i dr. Gistopatomorfologicheskie izmeneniya vnutrennih organov morskih svinok pri vvedenii protivotuberkuleznogo preparata KIM-M2 // Vestnik KrasGAU. 2019. № 8 (149). S. 97–102.
5. Krasil'nikov I.V., Nikolaeva A.M., Mashin V.V. Izuchenie vozmozhnosti ispol'zovaniya nano-dispersii `ekstrakta beresty v kachestve ad'yuvanta vakcinnyh preparatov // Sibirskij medicinskij zhurnal. Tomsk, 2011. Т. 26, № 2-2. S. 65–67.
6. Amiri S., Ghavami S., Dastghaib S. et al. Betulin and its derivatives as novel compounds with different pharmacological effects // Biotechnology advances. 2020. Vol. 38. P. 107–409.
7. Circu M.L., Aw T.Y. Reactive oxygen species, cellular redox systems, and apoptosis // Free Radical Biol. Med. 2010. Vol. 48 (6). P. 749–762.
8. Gel'berg S.I., Finkel' E.A. K metodike `eksperimental'nogo izucheniya immunogennyh svojstv protivotuberkuleznyh vakcin i `effektivnost' metodov ih primeneniya // Problemy tuberkuleza. 1959. № 2. S. 80–84.
9. Hrycek A. Functional characterization of peripheral blood neutrophils in patients with primary hypothyroidism // Folia Biol. (Praha). 1993. № 39 (6). S. 304–310.
10. Shubich M.G. Vyyavlenie kationnogo belka v citoplazme lejkocitov s pomosch'yu bromfenolovogo sinego // Citologiya. 1974. Т. 16, № 10. С. 1321–1322.

Literatura

1. Buddle B.M., Vordermeier H.M., Chambers M.A., de Klerk-Lorist L.M. Efficacy and safety of BCG vaccine for control of tuberculosis in domestic livestock and wildlife // Front. Vet. Sci. 2018. Vol. 5. P. 259.
10. Shubich M.G. Vyyavlenie kationnogo belka v citoplazme lejkocitov s pomosch'yu bromfenolovogo sinego // Citologiya. 1974. Т. 16, № 10. С. 1321–1322.