

МАЛИНИН МИХАИЛ ЛЕОНИДОВИЧ

**ВЗАИМОСВЯЗЬ МЕТАБОЛИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ И
УСТОЙЧИВОСТИ К БАКТЕРИАЛЬНЫМ ИНФЕКЦИЯМ У
ЖИВОТНЫХ НА ФОНЕ ДЕЙСТВИЯ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ, ИХ
АНТИГЕНОВ И ПРЕПАРАТОВ НА ОСНОВЕ НАНОЧАСТИЦ**

03.02.03 – микробиология
03.01.06 – биотехнология (в том числе бионанотехнологии)

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
доктора биологических наук

Саратов 2013

Работа выполнена в Государственном научном учреждении Саратовский научно-исследовательский ветеринарный институт Российской академии сельскохозяйственных наук

Научные консультанты: доктор ветеринарных наук, старший научный сотрудник
Ласкавый Владислав Николаевич,

доктор биологических наук, старший научный сотрудник
Дыкман Лев Абрамович

Официальные оппоненты: **Васильев Дмитрий Аркадьевич,**
доктор биологических наук, профессор
ФГБОУ ВПО «Ульяновская государственная сельскохозяйственная академия имени П.А. Столыпина»,
заведующий кафедрой микробиологии, вирусологии,
эпизоотологии и ветеринарно-санитарной экспертизы

Заднова Светлана Петровна
доктор биологических наук
ФКУЗ Российский научно-исследовательский
противочумный институт «Микроб»
ведущий научный сотрудник лаборатории
патогенных вибрионов

Лазурин Людмила Петровна
доктор биологических наук, профессор
ГБОУ ВПО Курский государственный медицинский
университет, заведующая кафедрой биологической и
химической технологии

Ведущая организация: ФГБОУ ВПО «Санкт-Петербургская государственная академия ветеринарной медицины»

Защита состоится «20» декабря 2013 г. в 13 часов на заседании диссертационного совета Д 220.061.04 при ФГБОУ ВПО «Саратовский государственный аграрный университет имени Н.И. Вавилова» по адресу: 410005, г. Саратов, ул. Соколова, 335, диссертационный зал.

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке ФГБОУ ВПО «Саратовский ГАУ» по адресу: 410005, г. Саратов, ул. Соколова, 335.

Автореферат диссертации разослан «__» _____ 2013 г.

Отзыв на автореферат направлять по адресу: 410012, г. Саратов, Театральная пл., 1, ФГБОУ ВПО «Саратовский ГАУ», ученому секретарю диссертационного совета.

Ученый секретарь диссертационного совета
доктор биологических наук, профессор

Карпунина Лидия Владимировна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Многие инфекционные заболевания характеризуются тем, что число инфицированных животных больше числа заболевших. В организме одних животных возбудитель ведет себя как паразит, в организме других – как сапротроф. Представляет интерес вопрос, от чего зависит реализация того или иного варианта взаимодействия макро- и микроорганизма.

В случае низкоконтагиозных заболеваний состояние макроорганизма, его реактивность играют существенную роль в развитии инфекции. В то же время, состояние организма характеризуется его метаболическим статусом, совокупностью важнейших биохимических параметров крови как ткани, связывающей воедино метаболизм прочих тканей и органов.

Данная работа посвящена изучению взаимодействия микро- и макроорганизма, в частности, формирования устойчивости к тому или иному инфекционному заболеванию, с учетом изменений метаболического статуса макроорганизма.

В качестве инфектов были выбраны кишечная палочка, синегнойная палочка и микобактерии.

Одним из инфекционных заболеваний, наносящих значительный урон животноводству и птицеводству, является колибактериоз (Бессарабов и др., 2008; Akashi et al., 1993). Колибактериоз часто вызывается токсигенными штаммами *Escherichia coli*. В отличие от млекопитающих, у птиц колибактериоз является типичной секундарной инфекцией, развивающейся на фоне сниженного иммунитета (Nolan et al., 1992).

При параллельном заражении птиц возбудителями других заболеваний (например, микоплазмами) необходимая для развития колибактериоза минимальная заражающая доза вирулентных штаммов *E. coli* может снижаться в тысячу и более раз (Chulasiri et al., 1989; Norton et al., 1992). Чаще других вызывают колибактериоз у птиц штаммы *E. coli* серовариантов O1, O2, O35, O78, O111 (Бессарабов, 2008; Arp, 1982). Более 58% эпизоотических штаммов *E. coli* не типизируются отечественными коммерческими коли-сыворотками (Валенкевич, Яхонтова, 2001).

В возникновении, развитии и исходе колибактериоза важнейшую роль играет резистентность организма птиц (Гуткин, Горбатов, 1984; Rosenberger et al., 1985). В связи с этим приобретает актуальность изучение реактивности организма птиц для понимания патогенеза заболевания и механизмов формирования эффективного иммунитета к нему (Stěpánek et al., 1987).

Среди возбудителей инфекционных заболеваний животных важное место занимает *Pseudomonas aeruginosa*. Для синегнойной палочки характерна высокая устойчивость ко многим антибиотикам и хорошая выживаемость в окружающей среде (Burns et al., 2001). *P. aeruginosa* относится к грамотрицательным неферментирующим микроорганизмам (Gales et al. 2001) и патогенна не только для животных, но и для человека (Foca et al., 2000). *P. aeruginosa* за счет способности накапливаться в окружающей среде поражает как молодняк, так и животных предубойного возраста (Estahbanati et al., 2002), причем заболевание нередко заканчивается летально. Синегнойная палочка, как возбудитель нозокомиальной инфекции, редко поражает здоровые ткани. Это придает актуальность изучению взаимодействия *P. aeruginosa* и макроорганизма.

Важной проблемой медицины и ветеринарии до сих пор остается профилактика, диагностика и лечение заболеваний человека и животных, вызываемых микобактериями туберкулеза (Lalvani, 2007). Одним из наиболее распространенных средств диагностики являются кожные пробы, основанные на использовании туберкулина в качестве аллергена (Ozekinci et al., 2007). Туберкулин представляет собой фильтрат убитых нагреванием культур *Micobacterium tuberculosis*, *M. bovis* или *M. avium*, состоящий, в основном, из термостабильных пептидов и карбоновых кислот. Действующим началом туберкулина является гаптен туберкулопротеин, вызывающий у инфицированных или вакцинированных пациентов при внутрикожном введении специфическую реакцию гиперчувствительности замедленного типа, проявляющуюся как местная реакция в виде гиперемии и инфильтратов. Особый интерес представляет способность золотых наночастиц вызывать гуморальную иммунную реакцию на слабоиммуногенные антигены и гаптены (Дыкман и др., 2010). Вышесказанное определяет актуальность создания биотехнологического препарата на основе конъюгата туберкулина с золотыми наночастицами для изучения механизмов формирования устойчивости животных к туберкулезу, совершенствования диагностики и профилактики этого заболевания.

Одной из ключевых задач современной прикладной микробиологии является определение комплекса наиболее информативных биохимических показателей крови животных, позволяющего адекватно оценить устойчивость или восприимчивость организма к инфекции.

Для биохимических показателей, отражающих устойчивость животных к различным инфекционным заболеваниям, характерна значительная онтогенетическая, индивидуальная и межвидовая вариабельность (Ермаков, 2008). Это определяет актуальность обоснования комплекса биохимических показателей, позволяющих решать вопросы устойчивости организма к инфекционным агентам. Данные по ферментативной активности сыворотки крови диких животных, в частности, желтогорлых мышей, из естественных мест обитания с различным экологическим статусом, могут использоваться как фоновые показатели при биомониторинге окружающей среды (Кияшко и др., 2009).

Степень разработанности проблемы. Вопрос о причинах изменения активности ферментов при различных состояниях и патологических процессах, вызванных микробными агентами, до сих пор окончательно не решен. Повышение активности индикаторных ферментов в плазме крови, согласно одной из гипотез, происходит, главным образом, за счет увеличения их выхода из пораженных клеток. Эта гипотеза подтверждается исследованием изоферментного спектра лактатдегидрогеназы (ЛДГ), креатинкиназы (КК) и других ферментов (Коровкин, 1966; Фридрих, 1986; Рослый, 1999). Однако данная гипотеза никак не объясняет нормальную активность ферментов. А между тем, большой интерес представляет вопрос о причинах и биологическом смысле наличия активности индикаторных ферментов в плазме крови в норме.

Согласно другой гипотезе, источником ферментов в крови при патологических процессах, в том числе, бактериальных инфекциях, могут быть и неповрежденные клетки. Эта гипотеза акцентирует внимание на двойном происхождении роста активности ферментов, который связан с выходом в кровь органоспецифических ферментов и с общей биохимической перестройкой организма (Рослый,

1999; Гавриш, 2007; Artiss, 1987; Harnett, 1994). Однако, существуют заболевания (например, грипп), при которых гиперферментемия не отмечается, хотя выраженный острый синдром есть (Мосолов, 1971).

Ферментемия может играть защитно-компенсаторную роль (Рослый, 2005; Гавриш, 2007; Charatwala, 1982; Jimoh, Odutuga, 2001). В частности, повышение активности КК указывает на защиту клеток от цитолиза и является маркером гипоксии (Guder et al., 1986). Синхронное увеличение активности КК и АСТ свидетельствует об интенсификации энергетического обмена. В то же время, значительное увеличение активности КК на фоне снижения активности АСТ – плохой прогностический признак, свидетельствующий об истощении энергоресурсов (Рослый, 2005). Повышение активности γ -глутамилтрансферазы (ГГТ) указывает на интоксикацию и аллергизацию организма, малигнизацию клеток, а также рассматривается как один из компенсаторных механизмов гипогликемического состояния. Щелочная фосфатаза (ЩФ) участвует в регуляции уровня глюкозы и ионизированного кальция в крови, в формировании пула фосфатов и синергично работает с буферными системами. Трансаминазы регулируют метаболические потоки, ЛДГ – окислительно-восстановительный статус (Mercen, 1974).

Таким образом, среди причин изменения метаболического статуса при бактериальных инфекциях выделяют выход ферментов из клеток пораженных тканей и органов на фоне усилившегося при патологическом процессе их биосинтеза.

Большой научный интерес и практическую значимость имеет решение вопросов, связанных с оценкой участия отдельных антигенных компонентов возбудителей в формировании ответных защитных реакций макроорганизма. Так, до сих пор многие вопросы, связанные с механизмами воздействия туберкулина на организм животного или человека, остаются открытыми. Известно, что антитела на туберкулин, при его внутрикожном введении, не образуются. Мажорный белок с молекулярной массой 9,7 кДа, входящий в состав туберкулина, способен вызывать ингибирование миграции макрофагов и частичное угнетение бласттрансформации лимфоцитов морских свинок и тем самым тормозить выработку антител (Kuwabara, 1975; Klausen et al., 1994). Лишь недавно был описан способ получения антитуберкулиновых поликлональных антител с использованием в качестве белка-носителя гемоцианина (Ho, Kairo, Corbel, 2006).

Последние достижения в области бионанотехнологий демонстрируют возможность использования наночастиц как средства доставки лекарственных препаратов к клеткам-мишеням (Mout et al., 2012). Однако чтобы достигнуть цели, наночастица должна обойти много преград, защитных барьеров против чужеродных антигенов в организме животного (Dobrovolskaia, McNeil, 2007). Применение наночастиц золота в качестве носителя антигенов и терапевтических агентов находит широкое применение в современной медицине и биологии (Dreaden et al., 2012; Dykman, Khlebtsov, 2012; Alkilany, Lohse, Murphy, 2012).

Цель работы состояла в выявлении взаимосвязи метаболических процессов в организме животных с формированием устойчивости к ряду инфекционных агентов и отборе комплекса наиболее информативных биохимических показателей; характеристике механизмов действия антигенных компонентов возбудителей – токсинов кишечной палочки, ЛПС синегнойной палочки и туберкулина на клеточ-

ном уровне; разработке и обоснованию применения конъюгата туберкулина с золотыми наночастицами в микробиологической и ветеринарной практике.

Для достижения поставленной цели необходимо было решить следующие **задачи**:

1. Изучить влияние иммунизации клетками штамма *E. coli* Б-5 на способность сыворотки крови цыплят нейтрализовать токсины различных культур *E. coli*, образовывать иммунокомплексы с токсинами и антитела к ЛПС вирулентных культур *E. coli*, продуцирующих термолабильный и термостабильный токсины.

2. Выявить закономерности изменения активности ферментов энергетического обмена в крови животных. Разработать биохимический показатель – индекс ферментемии – интегрирующий соотношения энергетического и пластического обмена, а также аэробного и анаэробного окисления углеводов. Определить референтные значения индекса ферментемии для лабораторных животных: морских свинок, белых крыс, белых мышей и кроликов; желтогорлых мышей из естественных биотопов; цыплят различных кроссов. Изучить видовые особенности значений индекса ферментемии в норме и при инфекционной патологии.

3. Изучить взаимозависимость активности трансаминаз и дыхательной активности лейкоцитов различных субпопуляций (гранулоцитов, лимфоцитов, перитонеальных клеток) в системе *in vitro* «клетки печени – лейкоциты». Проанализировать влияние цитокинов на метаболическую активность клеток печени.

4. Определить зависимость влияния ЛПС различных изолятов *P. aeruginosa* на дыхательную активность перитонеальных клеток белых крыс *in vitro* от вирулентности культур.

5. Проанализировать влияние PPD туберкулина для млекопитающих на рост микобактерий и кишечной палочки. Изучить возможность проникновения PPD туберкулина в иммунокомпетентные клетки животных. Разработать технологию получения конъюгата PPD туберкулина с золотыми наночастицами. Провести сравнительный анализ влияния PPD туберкулина и его конъюгата с наночастицами золота на дыхательную активность перитонеальных макрофагов, а также на показатели инфекционного процесса.

Научная новизна. Разработан новый биохимический показатель – индекс ферментемии, интегрирующий соотношения пластический/энергетический обмен и аэробное/анаэробное окисление углеводов в организме животных. Проведен сравнительный анализ метаболического статуса по показателям углеводного, белкового, липидного, минерального обменов в организме интактных, иммунизированных и инфицированных животных. Обнаружена взаимозависимость биохимических и иммунологических показателей у интактных, иммунизированных и инфицированных животных *in vitro* и *in vivo*. Проведено комплексное исследование метаболических и иммунологических процессов в организме животных при формировании устойчивости к заболеваниям, вызываемым *E. coli*, *P. aeruginosa*, *M. bovis*. Впервые теоретически обосновано и экспериментально подтверждено влияние метаболического статуса на формирование устойчивости животных к заболеваниям, вызываемым этими возбудителями. Проведены фундаментальные исследования по изучению участия клеток печени в регуляции иммунного и метаболического статуса на фоне воздействия возбудителей и их антигенов. Впервые

установлена зависимость влияния антигенов *E. coli* Б-5 на состояние клеточного и гуморального иммунитета от температуры выращивания культуры.

Теоретическая и практическая значимость работы. Теоретическая значимость исследования заключается в том, что основные его результаты способствуют расширению знаний в области взаимодействия макро- и микроорганизма, механизмов формирования устойчивости к инфекционным заболеваниям, изучения факторов неспецифической резистентности.

По материалам диссертации получено 7 патентов РФ: 1. Способ оценки устойчивости организма животного к туберкулезу (Ласкавый, Малинин, 2009); 2. Способ оценки физиологического состояния организма цыплят (Ласкавый, Малинин, 2010); 3. Вакцина против колибактериоза кур (Ласкавый, Джавадов, Малинин и др., 2010); 4. Добавка к питьевой воде для кур и способ ее применения (Ласкавый, Иваненко, Фисинин, Сергеев, Стремоусов, Панферов, Малинин и др., 2010); 5. Способ оценки восприимчивости крупного рогатого скота к туберкулезу (Ласкавый, Малинин, Панферов и др., 2012); 6. Способ оценки устойчивости крупного рогатого скота к лейкозу (Ласкавый, Малинин, Кузнецова и др., 2012); 7. Способ оценки устойчивости крупного рогатого скота к туберкулезу (Ласкавый, Малинин, Панферов и др., 2012).

Материалы диссертации используются в научно-практической работе ГНУ Саратовский научно-исследовательский ветеринарный институт Россельхозакадемии, в практической работе ООО «ВетТоргСервис», при чтении в ФГБОУ ВПО «Саратовский государственный университет имени Н.Г. Чернышевского» по дисциплинам «Микробиология», «Прикладная микробиология», «Медицинская микробиология», «Санитарная микробиология»; в ФГБОУ ВПО «Саратовский ГАУ имени Н.И. Вавилова» по дисциплинам «Внутренние незаразные болезни животных», «Лабораторная диагностика», «Токсикология», «Микробиология», «Иммунология», что подтверждается актами о внедрении. Материалы диссертации использованы при написании учебно-методического пособия: Интерпретация результатов лабораторных анализов, Саратов, 2013.

Методология и методы исследования. Методологической базой послужили труды как отечественных, так и зарубежных ученых по вопросам влияния факторов неспецифической резистентности на устойчивость животных к инфекционным заболеваниям. Данное исследование основано на комплексном анализе и системном подходе к изучению рассматриваемой проблемы.

При проведении исследования и изложения материала автором были применены общенаучные методы: теоретико-методологический анализ литературных источников, эмпирические методы исследования в форме наблюдения, эксперимента, описания, измерения и сравнительно-сопоставительного анализа.

Применение указанных методов, а также анализ фактического материала позволил обеспечить объективность полученных выводов и результатов.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Иммунизация цыплят штаммом *E. coli* Б-5 формирует антитоксическую защиту широкого спектра, эффективную против различных токсинообразующих штаммов *E. coli*.

2. Определение индекса ферментемии, отражающего баланс катаболических процессов центральной зоны и анаболических процессов периферической зоны

метаболизма, а также баланс анаэробного и аэробного этапов энергетического обмена, позволяет определять направление метаболических изменений в организме интактных, иммунизированных и инфицированных животных.

3. В системах *in vitro* повышение активности АСТ сопровождается увеличением метаболической активности лейкоцитов. В свою очередь, высокая метаболическая активность лейкоцитов подавляет выделение АСТ клетками печени.

4. Туберкулин более чем в 10 раз подавляет дыхательную активность перитонеальных макрофагов и втрое снижает адсорбцию бактериальных клеток на ПК. Использование вместо чистого туберкулина его конъюгата с золотыми наночастицами не подавляет дыхательную активность макрофагов и на 67% увеличивает адсорбцию бактериальных клеток на ПК.

5. Использование конъюгатов антикороличьих антител с золотыми наночастицами позволяет выявлять туберкулиновый антиген на клетках *M. bovis*. Данный метод может применяться для обнаружения микобактерий в различных объектах окружающей среды. Конъюгирование туберкулина с золотыми наночастицами способствует развитию гуморальной реакции, выработке антител на туберкулин.

Апробация результатов исследований. Материалы диссертации были представлены на: Юбилейной конференции «Актуальные проблемы ветеринарии в современных условиях» (Краснодар, 2006); VII Всероссийской научно-практической конференции «Ветеринарная медицина. Современные проблемы и перспективы развития» (Саратов, 2007); Международной научно-практической конференции «Научные основы производства ветеринарных биологических препаратов» (Щелково, 2007); IV Международной конференции «Идеи Пастера в борьбе с инфекциями» (Санкт-Петербург, 2008); Всероссийской научно-практической конференции «Проблемы, задачи и пути научного обеспечения приоритетного национального проекта «Развитие АПК»» (Новочеркасск, 2008); Международном Рабочем совещании «Инновационные подходы в профилактике, диагностике и лечении зооантропонозных и метаболических болезней животных и человека в Саратовской области» (Саратов, 2009); Международной конференции, посвященной 80-летию Самарской НИВС Россельхозакадемии (Самара, 2009); Всероссийской научно-практической конференции «Повышение продуктивности сельскохозяйственных животных и птиц на основе инновационных достижений» (Новочеркасск, 2009); Международной научно-практической конференции «Вавиловские чтения» (Саратов, 2010); Межрегиональной научно-практической конференции «Актуальные проблемы ветеринарии и животноводства» (Самара, 2010); Международной научно-практической конференции, посвященной 65-летию ветеринарной науки Кубани «Актуальные проблемы современной ветеринарии» (Краснодар, 2011); Международной научно-практической конференции «От теории – к практике: вопросы современной ветеринарии, биотехнологии и медицины» (Саратов, 2011); Международной научно-практической конференции «Экологические проблемы использования природных и биологических ресурсов в сельском хозяйстве» (Екатеринбург, 2012); Международной юбилейной научно-практической конференции, посвященной 45-летию ГНУ Прикаспийский ЗНИВИ «Проблемы ветеринарной медицины в условиях реформирования сельского хозяйства» (Махачкала, 2012); Международной научно-практической конференции «Проблемы ветеринарной ме-

дицины и зооэкологии Российского и Азиатско-Тихоокеанского регионов» (Благовещенск, 2012).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 35 работах, из них 10 статей в журналах, рекомендованных ВАК РФ, а также 7 патентов РФ и учебно-методическое пособие.

Личный вклад автора. Автор принимал непосредственное участие в формулировании и разработке теоретических положений, планировании и проведении экспериментов, получении и систематизации данных, в апробации результатов исследования. Экспериментальные исследования были выполнены диссертантом лично или при непосредственном участии в составе научной группы при выполнении НИР. Автором лично разработаны модификации методик и выполнен статистический анализ массива данных.

Работа выполнена в Государственном научном учреждении Саратовский научно-исследовательский ветеринарный институт Российской академии сельскохозяйственных наук в период с 2003 по 2013 годы в рамках научно-исследовательской темы: «Изучение основных закономерностей взаимодействия организма животных и микроорганизмов, обеспечивающие между ними стойкое биологическое равновесие» программы фундаментальных и приоритетных прикладных исследований по научному обеспечению развития АПК РФ: «Разработка молекулярно-биологических основ совершенствования и создания новых высокоэффективных и экологически безопасных методов, средств, технологий и систем диагностики, профилактики и терапии болезней животных, обеспечивающих устойчивое ветеринарное благополучие и получение продукции животноводства высокого санитарного качества»; «Усовершенствовать существующие и разработать новые методы, средства, технику и технологии диагностики, лечения и профилактики особо опасных и наиболее распространенных болезней животных, птиц, рыб и насекомых на основе изучения молекулярно-биологических и генетических механизмов их развития, с целью получения сырья и продукции высокого санитарного качества» Плана фундаментальных и приоритетных прикладных исследований Россельхозакадемии по научному обеспечению развития АПК Российской Федерации на 2011-2015 годы.

Структура и объем работы. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, 9 глав собственных исследований, обсуждения полученных результатов, заключения, выводов, практических рекомендаций, списка использованной литературы и приложений. Работа изложена на 390 страницах машинописного текста, иллюстрирована 77 таблицами и 39 рисунками. Список литературных источников включает 662 наименования, в том числе 450 зарубежных.

СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Объекты и методы исследований

Объекты исследований. В работе использовали культуры: *E. coli* Б-5 (получен из ГНУ Саратовский научно-исследовательский ветеринарный институт Россельхозакадемии), *E. coli* №388 (O2) и *E. coli* № 389 (O78) (получены из ГНУ Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии Россельхозакадемии), полевой изолят *E. coli* №1 (выделен из костного мозга павшего цыпленка с признаками колибактериоза в ГНУ Саратовский НИВИ Россель-

хозакадемии), 2 вирулентных и 3 авирулентных полевых изолята *P. aeruginosa* (выделены из спермы хряков-производителей в ГНУ Саратовский НИВИ Россельхозакадемии); штамм *M. bovis* VCG (ОАО «Зооветснаб»); штамм *Azospirillum brasilense* Sp245 (из коллекции ризосферных микроорганизмов ФГБУН Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов Российской академии наук).

Из данных культур были выделены и использованы в работе: токсинсодержащий материал, внешняя мембрана и ЛПС штаммов *E. coli* Б-5, *E. coli* №388 (O2), *E. coli* № 389 (O78), изолята *E. coli* №1; ЛПС пяти изолятов *P. aeruginosa* и штамма *A. brasilense* Sp245. В качестве микробного антигена применяли РРД туберкулин для млекопитающих (ФГУП «Курская биофабрика-фирма «БИОК», Россия).

В экспериментах было использовано 350 цыплят, в том числе 100 голов цыплят-бройлеров кросса «Ross-308», 250 голов цыплят яйценоских кроссов, в том числе 200 голов цыплят кросса «Родонит-2» и 50 голов цыплят кросса «Super Nick»; 600 белых крыс; 450 морских свинок; 1200 белых мышей; 150 кроликов, а также 30 желтогорлых мышей. Животные содержались на стандартном рационе вивария Саратовского научно-исследовательского ветеринарного института Россельхозакадемии. Все манипуляции с животными проводились в соответствии с Международными правилами гуманного отношения к животным и с Модельным законом государств-участников СНГ об обращении с животными от 31.10.2007.

Методы исследований. Микробиологические исследования включали изучение основных тинкториальных, морфологических, культуральных и биохимических характеристик штаммов и изолятов возбудителей инфекций животных по общепринятым методикам (Колычев, Госманов, 2006). Антигенное сходство штаммов и изолятов выявляли методами твердофазного иммунодот-анализа с антителами, мечеными золотыми наночастицами (Дыкман, 2008), обратной радиальной иммунодиффузии (Фримель, 1987), токсинообразования (Гусев, 2004).

Липополисахарид (ЛПС) выделяли методом горячей водно-фенольной экстракции (Westphal, 1965). Присутствие токсинсодержащего материала (ТСМ) в культуральной жидкости определяли по изменению дыхательной активности перитонеальных клеток мыши (ПКМ) в НСТ-тесте (Маянский, 1979)

Выделение и очистку белков туберкулина проводили методом высаливания сульфатом аммония с последующей очисткой выделенных белковых фракций методом высокоэффективной жидкостной хроматографии; чистоту фракций проверяли SDS-электрофорезом в 20% полиакриламидном геле.

Моделирование инфекционного процесса и иммунизацию животных и цыплят проводили по общепринятым методам. Кровь для биохимических исследований у лабораторных животных отбирали из сердца (у грызунов), пунктированием краевой вены уха (у кроликов), пунктированием подкрыловой вены (у птиц).

Гематологические исследования проводили на гематологическом анализаторе Abacus 5 и микроскопе БИММ Р-14.

Сыворотку крови получали по общепринятой методике. Биохимические исследования образцов сыворотки крови проводили на программируемом фотометре BS 3000 P Sinnova (КНР). Концентрацию общего белка, альбуминов, глобулинов, мочевины, мочевой кислоты, креатинина, общего холестерина и его фракций, триглицеридов, глюкозы, индекс атерогенности, активность ферментов АЛТ, АСТ, КК, ЛДГ, ГГТ, ЩФ, КФ, липазы, α -амилазы, а также содержание фосфора, магния,

кальция и железа определяли по общепринятым методикам (Камышников, 2000). Выбор биохимических показателей определялся необходимостью изучения метаболических изменений по основным видам обмена.

Иммунологические исследования включали определение параметров фагоцитоза (Тихомирова, 2005), бактерицидной активности сыворотки крови, образования иммунокомплексов *in vitro* (Hashkova, 1978), наличия в крови специфических антител, нейтрализующих ТСМ указанных выше штаммов и изолятов *E. coli*.

Выделение и культивирование перитонеальных макрофагов и клеток селезенки проводилось по стандартным методикам (Leiter et al., 2001). Дыхательную активность определяли по способности клеток восстанавливать нитротетразолевый синий в формазан (Bernas, Dobrucki, 2000). Количественное определение концентрации восстановленного формазана проводили на программируемом фотометре BS 3000 P Sinnowa (КНР), $\lambda=490$ нм.

Золотые наночастицы со средним диаметром частиц 15 нм получали, используя реакцию восстановления золотохлористоводородной кислоты цитратом натрия (Frens, 1973). Для определения «золотого числа» (минимального количества антигена, защищающего золь от солевой агрегации) для водных растворов туберкулина и антител двукратно по 20 мкл титровали раствор антигена в воде с начальной концентрацией 300 мкг/мл для туберкулина. В каждую лунку добавляли по 200 мкл коллоидного золота и по 20 мкл 1,7 М NaCl. Минимальная стабилизирующая концентрация для антигена составила 1,2 мкг/мл. Конъюгацию проводили без использования сшивающих агентов.

Для проведения световой микроскопии препаратов, окрашенных конъюгатом туберкулина с золотыми наночастицами, использовали авторскую модификацию (Дыкман, 2007). Клетки микобактерий отмывали от питательной среды и ресуспендировали в 0,01 М фосфатно-солевом буфере (pH=7,2) до концентрации 1×10^9 м.к./мл. Затем к суспензии микробных клеток добавляли растворы антител в концентрации 1 мкг/мл и инкубировали 1 ч при комнатной температуре. Производили двукратную отмывку от не связавшихся с микробными клетками антител центрифугированием (6000 g, 15 мин) и обрабатывали микробную взвесь вторичными антителами, конъюгированными с золотыми наночастицами ($A_{520}=0,1$). Проводили повторную отмывку от не связавшегося с микробными клетками конъюгата в течение 1 ч при комнатной температуре центрифугированием (1000 g, 15 мин). Осадок ресуспендировали в 1 мл фосфатно-солевого буфера и готовили влажный препарат. Микроскопировали в просвечивающем режиме без физического контрастирования с использованием микроскопа DM1 3000 (LEICA, Германия). Для получения оптических срезов использовали конфокальный лазерный микроскоп TCS SP5 (LEICA, Германия).

При проведении электронной микроскопии клетки микобактерий наносили на никелевые сеточки с формваровой подложкой. После нанесения препарата проводили его блокировку 1% раствором БСА. Препарат подсушивали и погружали в раствор антител с концентрацией 1 мкг/мл. Препарат отмывали, сеточку подсушивали и инкубировали в растворе вторичных антител, конъюгированных с золотыми наночастицами. Затем проводили повторную отмывку и подсушивание препарата (Дыкман, 2008). Использовали электронный микроскоп Libra 120 (Carl Zeiss, Германия).

Статистическую обработку экспериментальных данных проводили по общепринятым методикам (Ашмарин и др., 1962; Лакин, 1990). Расчетные величины определяли с помощью встроенного статистического пакета Excel (MS Office 2007).

Результаты исследований и их обсуждение

Оценка токсинпродуцирующей способности штаммов *E. coli* №388 (O2), *E. coli* №389 (O78) и изолята *E. coli* №1 и образования к ним антител в организме цыплят кросса «Родонит-2»

Изучение тинкториальных, культурально-морфологических, биохимических свойств бактерий вирулентных для птиц штаммов *E. coli* №388 (O2), *E. coli* №389 (O78), изолята *E. coli* №1, а также авирулентного для птиц штамма *E. coli* Б-5, показало их соответствие свойствам типового вида *E. coli*.

Для изучения формирования у цыплят, иммунизированных клетками штамма *E. coli* Б-5, иммунитета к поверхностным антигенам изучавшихся в работе вирулентных для птиц культур *E. coli* применяли тест обратной радиальной иммунодиффузии. Результаты исследований показали наличие линейной зависимости квадрата диаметра зоны преципитации от дозы иммунизации и от кратности разведения образцов сыворотки крови для штамма *E. coli* Б-5 и изолята *E. coli* №1. Следовательно, с антителами к штамму *E. coli* Б-5 образовывали *in vitro* иммунные комплексы антигены не только этого штамма, но и изолята *E. coli* №1. В то же время, для штаммов *E. coli* №388 (O2) и №389 (O78) зависимость размера зоны преципитации от дозы иммунизации цыплят и от кратности разведения сыворотки крови отсутствовала.

При использовании метода твердофазного иммунодот-анализа с антителами, мечеными золотыми наночастицами, адсорбировали на мембране PVDF антигены (внешняя мембрана и ЛПС бактерий указанных штаммов и изолята *E. coli*) в титре до 1/512. В качестве положительного контроля использовали ЛПС и внешнюю мембрану бактерий штамма *E. coli* Б-5, в качестве отрицательного контроля – ЛПС и внешнюю мембрану клеток *Pseudomonas aeruginosa* (Rawadi, 1996). В образцах сыворотки крови цыплят, иммунизированных бактериями штамма *E. coli* Б-5, были обнаружены антитела к ЛПС бактерий этого штамма, но не было обнаружено антител к ЛПС штаммов *E. coli* №388 (O2), *E. coli* №389 (O78), изолята *E. coli* №1. Это свидетельствовало о том, что бактерицидные свойства сыворотки крови иммунизированных цыплят не определялись с наличием специфических антител к ЛПС вирулентных штаммов и изолятов. В иммунодот-анализе с внешней мембраной штамма *E. coli* Б-5 и изолята *E. coli* №1 в качестве антигенов было показано образование комплексов антиген-антитело. При этом для штамма *E. coli* Б-5 титр сыворотки крови составлял 1/512, а для изолята *E. coli* №1 – 1/32. С внешней мембраной вирулентных для птиц штаммов *E. coli* №388 (O2) и *E. coli* №389 (O78) комплексы антиген-антитело не образовывались. Это указывало на наличие во внешней мембране клеток изолята *E. coli* №1, в отличие от клеток штаммов *E. coli* №388 (O2) и №389 (O78), структур, взаимодействующих с антителами сыворотки крови иммунизированных бактериями штамма *E. coli* Б-5 цыплят.

Был получен токсинсодержащий материал (ТСМ) из культуральных жидкостей штаммов *E. coli* №388 (O2), *E. coli* №389 (O78) и изолята *E. coli* №1; токсичность проб ТСМ определяли по изменению дыхательной активности перитонеальных клеток мыши (ПКМ) в НСТ-тесте (Mosmann, 1983). Результаты экспериментов свидетельствовали о том, что ТСМ присутствовали в культуральных жидкостях всех исследовавшихся штаммов и изолята *E. coli* (рисунок 1).

Определяли также наличие в образцах сыворотки крови иммунизированных цыплят специфических антител, нейтрализующих токсины указанных штаммов и изолята *E. coli*. Сыворотка крови цыплят кросса «Родонит-2», иммунизированных бактериями штамма *E. coli* Б-5, содержала антитела, в полной мере нейтрализующие термолабильный токсин штамма *E. coli* Б-5 и на 60% нейтрализующие ТСМ изолята *E. coli* №1. ТСМ штаммов *E. coli* №388 (O2) и *E. coli* №389 (O78) не нейтрализовывались сывороткой крови иммунизированных цыплят на 22% и 24% соответственно.

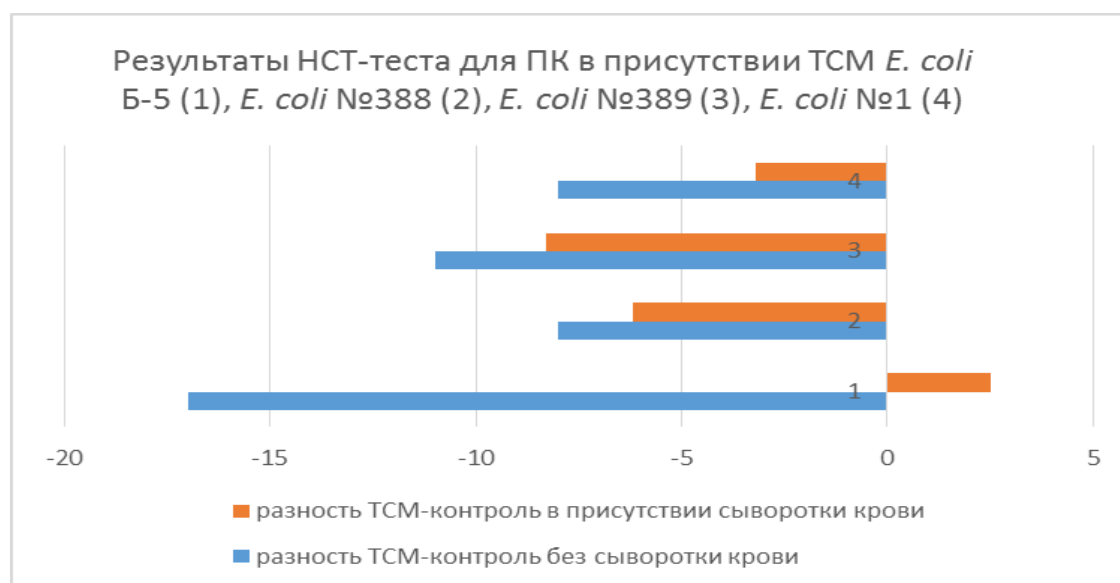


Рисунок 1 – Разность опытных и контрольных проб (нг формазана на 1 млн ПКМ) для взвеси ПКМ с ТСМ вирулентных штаммов и сывороткой крови цыплят, иммунизированных *E. coli* Б-5 в дозе 1 млрд. м.к.

Мы предположили, что величина токсиннейтрализующей активности сыворотки крови зависит от термолабильности ТСМ. ТСМ всех исследовавшихся культур *E. coli* были проанализированы на термолабильность токсина по агрегативной способности тромбоцитов. Средний радиус агрегатов тромбоцитов в обогащенной тромбоцитами плазме крови кролика при добавлении культуральной жидкости изолята *E. coli* №1, прогретой при 56°C, уменьшался по сравнению с действием нативной культуральной жидкости на 40%, что подтверждало термолабильность токсина.

В то же время, радиус агрегатов при добавлении образцов культуральной жидкости штаммов *E. coli* №388 (O2) и *E. coli* №389 (O78) не зависел от предварительного прогрева. Это указывало на отсутствие в культуральных жидкостях данных штаммов термолабильного токсина.

Индекс ферментемии как интегральный показатель энергетического обмена

Для более точной оценки метаболического статуса жифотных нами предложен новый расчетный показатель – индекс ферментемии (ИФ), представляющий собой безразмерную величину и увязывающий активность ферментов АСТ, АЛТ, КК и ЛДГ. КК и АСТ отражают активность биохимических процессов центральной зоны метаболизма, а ЛДГ и АЛТ – активность процессов периферической зоны метаболизма. Индекс ферментемии определяется по формуле:

$$\text{ИФ} = \text{АСТ/АЛТ} + \text{АСТ/ЛДГ} + \text{КК/ЛДГ}$$

В соотношении АСТ/АЛТ (коэффициент Де Ритиса) АСТ отражает активность реакций центрального звена метаболизма, регулирует поступление субстратов в цикл Кребса с последующим их аэробным окислением, выполняет детоксицирующую функцию по отношению к аммиаку, включая его в цикл синтеза мочевины, а также обеспечивает восстановление в тканях содержания аспартата, снижающегося при дисбалансе аминокислот и гипоксии. АЛТ – показатель активности альтернативных путей метаболизма глюкозы, взаимопревращений глюкозы и аланина в глюкозо-аланиновом цикле. В реакции, катализируемой АЛТ, аминокислоты различных аминокислот переносятся на пируват. Образующийся аланин поступает в кровь и по системе воротной вены переносится в печень. Глюкозо-аланиновый цикл служит каналом передачи азота и предшественников глюкозы в печень; там происходит синтез конечных продуктов азотистого обмена, например, мочевины. АЛТ является показателем анаболического звена метаболизма. Таким образом, соотношение АСТ/АЛТ отражает соотношение энергетического и пластического обмена. Креатинкиназа контролирует синтез одного из важнейших макроэргов – креатинфосфата. В химических связях 1 моль креатинфосфата аккумулируется в полтора раза больше энергии по сравнению с АТФ. Активность КК отражает состояние катаболизма, т.к. энергия, аккумулирующаяся в креатинфосфате, высвобождается при окислении органических веществ. Направление обратимой реакции, катализируемой креатинкиназой (фосфорилирование креатина – дефосфорилирование креатинфосфата), зависит от рН среды, который, в свою очередь, во многом определяется активностью ЛДГ, контролирующей образование лактата. КК при увеличении затрат АТФ стимулирует процессы окислительного фосфорилирования в митохондриях и активно влияет как на гликолиз, так и на глюконеогенез, опосредованно взаимодействуя с ферментами обоих этих процессов. При активизации гликолиза происходит уменьшение рН за счет увеличения образования молочной кислоты. В результате равновесие в реакции, катализируемой КК, смещается в сторону образования креатинфосфата за счет АТФ, образующейся в гликолизе. Таким образом, КК влияет на уровень глюкозы в крови. Креатинкиназа участвует также в системе адаптации организма к изменяющимся биоэнергетическим потребностям миокарда, мозга и мышц при разном уровне кровоснабжения.

В то же время ЛДГ катализирует последнюю реакцию молочнокислого брожения – образование лактата. Лактат с током крови поступает в печень, где конвертируется в глюкозу. Образование лактата может временно заменить аэробное окисление глюкозы, причем частично переносит этот процесс из мышц в печень. Активность ЛДГ отражает также состояние цикла Кори, в котором происходит восстановление пирувата до лактата и синтез на основе лактата глюкозы, т.е. реак-

ции анаболического звена метаболизма. Соотношение АСТ/ЛДГ отражает соотношение аэробного и анаэробного окисления углеводов.

Чем выше значение ИФ в сыворотке крови, тем выше активность катаболических процессов центральной зоны метаболизма по сравнению с реакциями периферической зоны метаболизма. Изменения индекса ферментемии могут более достоверно свидетельствовать о нарушениях обмена веществ, чем изменение активности отдельных ферментов.

Определение индекса ферментемии позволило выявить глубокие метаболические различия у цыплят цыплят-бройлеров кросса «Ross-308» и цыплят яйценоского кросса «Родонит-2»: у первых индекс ферментемии достоверно снижался с возрастом, указывая на все возрастающую роль пластического обмена, у вторых – сохранял стабильность в течение всего периода наблюдений.

Через две недели после заражения не иммунизированных цыплят вирулентными штаммами *E. coli* индекс ферментемии снижался в 4,9 раза по сравнению с интактными цыплятами (рисунок 2); у цыплят, иммунизированных в возрасте 14 дней дозой $1 \cdot 10^6$ м.к. на голову, ИФ снижался в 1,5 раза; у цыплят, иммунизированных в возрасте 22 дня дозой $1 \cdot 10^6$ м.к. на голову, ИФ достоверно не отличался от незараженного контроля; у цыплят, иммунизированных в возрасте 22 дня дозой $5 \cdot 10^5$ м.к. на голову, ИФ увеличивался на 80% ($p < 0,01$).



Рисунок 2 – Значения индекса ферментемии в сыворотке крови иммунизированных против колибактериоза цыплят кросса «Родонит-2», спустя 2 недели после заражения их вирулентными штаммами *E. coli* (А – контроль интактный; В – контроль зараженный; С – цыплята, иммунизированные в возрасте 14 суток дозой 1 млн м.к.; D – цыплята, иммунизированные в возрасте 22 суток дозой 1 млн м.к.; E – цыплята, иммунизированные в возрасте 14 суток дозой 0,5 млн м.к.)

При определении значений индекса ферментемии у интактных лабораторных животных оказалось, что у белых крыс ИФ ($10,50 \pm 0,9$) в 5 раз выше, чем у морских свинок ($2,15 \pm 0,2$), в 3 раза выше, чем у кроликов ($3,63 \pm 0,4$), и в 2 раза выше, чем у белых мышей ($5,39 \pm 0,7$). Это в целом коррелирует с устойчивостью данных к заражению туберкулезом.

Более высокие значения индекса ферментемии в сыворотке крови желтогорлых мышей из пессимальных биотопов по сравнению с оптимальными ($23,14 \pm 1,7$

и $15,08 \pm 1,1$ соответственно) подтверждали более высокую активность у них катаболических процессов центральной зоны метаболизма.

Антигены *E. coli* Б-5, их воздействие на иммунологические и биохимические параметры в зависимости от температуры выращивания культуры

При изучении воздействия клеток и антигенов возбудителей инфекционных заболеваний на макроорганизм мы исходили из предположения, что ферменты, присутствующие в плазме крови, являются не только маркерами происходящих процессов, но и активно влияют на состояние организма. В первую очередь, это касается системы иммунитета, поскольку эффекторы иммунного ответа, лейкоциты, погружены в иммунологически и биохимически активную среду – кровь, печень же является основным белоксинтезирующим органом, а также органом кроветворения (в эмбриональном периоде) и детоксикации. Воздействие антигенов уже на уровне печени и системы крови должно приводить как к изменению энзиматического фона, так и к модуляции иммунологического ответа.

Поскольку температура тела цыплят в норме достигает 42°C , а оптимальная температура роста культуры кишечной палочки составляет $37 \pm 0,5^\circ\text{C}$, *E. coli* Б-5 выращивали при 37°C и 42°C в течение ночи на плотной среде Эндо. Полученные колонии в целом были типичны для кишечной палочки, но в случае выращивания при 42°C они были крупнее и с выпуклым центром.

Определяли активность ферментов в плазме крови кролика после инкубации крови *in vitro* с антигенами *E. coli* Б-5 из культур, выращенных при 37°C и 42°C . Результаты определения приведены в таблице 1.

Таблица 1 – Биохимия плазмы крови после инкубации с антигенами *E. coli* Б-5

Параметры	Биомасса и КЖ, 37°C	Биомасса и КЖ, 42°C	Контроль
КК, мккат	$23,12 \pm 0,3^{1)}$	$22,70 \pm 2,1^{1)}$	$16,80 \pm 1,5$
АСТ, мккат	$0,64 \pm 0,1$	$0,88 \pm 0,1$	$0,82 \pm 0,1$
АЛТ, мккат	$0,52 \pm 0,05$	$0,26 \pm 0,03^{1), 2)}$	$0,61 \pm 0,05$
Коэффициент Де Ритиса	$1,23 \pm 0,1$	$3,34 \pm 0,3^{1), 2)}$	$1,34 \pm 0,1$
ЛДГ, мккат	$6,94 \pm 0,5$	$7,75 \pm 0,8$	$8,28 \pm 0,9$
Индекс ферментемии	$4,62 \pm 0,5$	$6,35 \pm 0,5^{1), 2)}$	$3,43 \pm 0,4$

Примечания – ¹⁾ Достоверные ($p < 0,05$) отличия от контроля

²⁾ Достоверные ($p < 0,05$) различия между группами « 37°C » и « 42°C ».

В системе крови активность ферментов реагирует на антигены *E. coli* Б-5. Инкубация с антигенами *E. coli* Б-5 сопровождалась увеличением в плазме крови активности КК, значений коэффициента Де Ритиса и индекса ферментемии, снижением активности АЛТ, ЛДГ. Характерно, что в плазме крови под влиянием антигенов *E. coli* Б-5, выращенной при 37°C , достоверно изменяется только активность КК, а под влиянием антигенов *E. coli* Б-5, выращенной при 42°C – активность КК, АЛТ, величина коэффициента Де Ритиса и индекса ферментемии.

Активность АЛТ в обоих случаях снижалась, но при выращивании культуры *E. coli* Б-5 при 37°C – лишь на 15% ($p > 0,05$), а при выращивании при 42°C – на 57% ($p < 0,05$). Снижение активности АЛТ приводит к смещению метаболического акцента в сторону катаболизма, что способствует нейтрализации токсинов метаболическими системами клеток.

Увеличение коэффициента Де Ритиса отражает преобладание катаболических реакций над анаболическими, сопровождающееся аккумулярованием энергии в виде АТФ. При выращивании при температуре 37°C величина коэффициента Де Ритиса под воздействием КЖ и биомассы *E. coli* Б-5 снижалась на 8% ($p > 0,05$), а при выращивании при 42°C – возрастала в 2,5 раза ($p < 0,05$).

Высокая активность КК связана с образованием мембранопротектора креатинфосфата, а также с активностью цитоскелета. Под воздействием КЖ и биомассы *E. coli* Б-5, выращенной при 37°C и 42°C, приблизительно в одинаковой степени (в 1,4 раза) увеличивалась активность КК плазмы крови.

Индекс ферментемии в обоих случаях (при выращивании культуры при температуре 37°C и 42°C) возрастал, но в случае выращивания культуры *E. coli* Б-5 при 37°C – на 35% ($p > 0,05$), а в случае выращивания при 42°C – на 85% ($p < 0,05$).

Нами обнаружена зависимость бактериостатической активности плазмы крови в отношении вирулентного штамма *E. coli* №389 (O78) от уровня активности ферментов (таблица 2). Рост *E. coli* обратно коррелирует с активностью ЛДГ и АСТ. Сравнительный анализ воздействия антигенов *E. coli* Б-5 из культур, выращенных при 37°C и 42°C, действительно, обнаруживает некоторую тенденцию к повышению активности ЛДГ и АСТ в плазме крови.

Таблица 2 – Корреляция плотности культур *E. coli* №389 (O78) в образцах плазмы крови цыплят с биохимическими показателями

Показатели	Коэффициенты Пирсона, r, для плотности культуры <i>E. coli</i> №389 (O78) и соответствующего биохимического показателя
КК	+0,76±0,2 ($p < 0,02$)
АСТ	-0,87±0,2 ($p < 0,002$)
АЛТ	0
ЛДГ	-0,99±0,05 ($p < 0,001$)
ЩФ	-0,66±0,3 ($p < 0,05$)
Кислая фосфатаза	+0,56±0,3 ($p > 0,05$)
ГГТ	-0,01±0,4 ($p > 0,05$)

Влияние антигенов *E. coli* Б-5 на биохимические показатели плазмы крови сходно с взаимозависимостью роста *E. coli* №389 (O78) и биохимических параметров, причем клетки *E. coli* №389 (O78) использовались живые, а клетки *E. coli* Б-5 – убитые нагреванием. Так, внесение антигенов *E. coli* Б-5 сопровождается увеличением в плазме крови активности КК и тенденцией к снижению активности ЛДГ. В то же время, рост штамма *E. coli* №389 (O78) в плазме крови тем интенсивнее, чем выше активность КК и ниже активность ЛДГ. Это указывало на взаимное влияние друг на друга ферментативной системы плазмы крови и бактериальных клеток.

Изучали также опосредованное ферментативной активностью плазмы крови влияние биомассы и КЖ *E. coli* Б-5, выращенной при температуре 37°C и 42°C, на киллерную активность лимфоцитов в отношении клеток *Candida albicans*. Антидрожжевую активность (АДА) рассчитывали по формуле:

АДА = 1 - ([число жизнеспособных дрожжевых клеток в суспензии] / [исходное число клеток]).

Результаты определения антикандидального индекса в зависимости от температуры выращивания *E. coli* Б-5 отражены в таблице 3.

Таблица 3 – Антидрожжевая активность лимфоцитов в системе «плазма крови / лимфоциты» при инкубации с антигенами *E. coli* Б-5

Температура выращивания <i>E. coli</i> Б-5	37°C	42°C	Контроль (среда 199)
Антидрожжевая активность	0,48±0,03	0,62±0,01	0,11±0,06

Полученные данные показывают, что внесение антигенов *E. coli* Б-5 стимулирует антидрожжевую активность лимфоцитов-киллеров. Антидрожжевая активность под влиянием антигенов культуры *E. coli* Б-5, выращенной при 37°C, увеличивается в 4,4 раза, а под влиянием антигенов культуры *E. coli* Б-5, выращенной при 42°C – в 5,6 раза.

Таким образом, установлено, что культура *E. coli* Б-5 способна расти при различных физиологических значениях температур, от 37°C до 42°C. При этом происходит изменение поверхностных структур клетки и/или экскретируемых продуктов, выражающееся в изменении влияния на активность ферментов в плазме крови животных, на опосредованную ферментами активность лимфоцитов, на бактериостатическую активность плазмы крови. Эффект более выражен при температуре выращивания *E. coli* Б-5 42°C.

В плазме крови кролика *in vitro* под воздействием антигенов *E. coli* Б-5 повышается индекс ферментемии – интегральный показатель метаболической активности, что на уровне организма может сказываться положительно на повышении устойчивости к инфекции за счет интенсификации окислительно-восстановительных реакций. Плазма крови может опосредованно влиять на метаболическую активность лейкоцитов, что положительно сказывается на состоянии иммунной системы организма. При этом метаболизм лимфоцитов и фагоцитов связан с активностью КК, АЛТ, с индексом ферментемии и коэффициентом Де Ритиса. Эффект более выражен при температуре выращивания культуры 42°C.

Антигены *E. coli* Б-5 стимулируют активность лимфоцитов-киллеров в отношении дрожжей. Эффект более выражен при температуре выращивания 42°C.

Вакцина против колибактериоза кур

Результатом проведенных исследований явилась разработка вакцины против колибактериоза кур на основе штамма *E. coli* Б-5. Вакцина представляет собой суспензию микробных клеток в 15мМ NaCl, содержащую в 1 мл 1-2 млн м.к. При более низком содержании микробных клеток снижается эффективность вакцины, при более высоком – вакцина становится более токсичной, негативно влияя на привесы.

Протективное действие вакцины определяли по динамике привесов и патологоанатомическому исследованию иммунизированных и неиммунизированных цыплят кросса «Родонит-2» при заражении вирулентными штаммами *E. coli*. Вакцину вводили 22-дневным цыплятам перорально, по 0,5 мл на голову. Через 23 дня после иммунизации цыплят заражали вирулентными культурами *E. coli* №388 (O2), *E. coli* №389 (O78), *E. coli* №1 в дозе $6 \cdot 10^7$ м.к. на голову. Еще через 12 дней

(в возрасте 57 суток) проводили взвешивание и вынужденный убой цыплят; изучали патологические изменения внутренних органов. Результаты гравиметрического анализа отражены в таблице 4.

Наибольшими были привесы у цыплят, иммунизированных дозами $5 \cdot 10^5$ и $1 \cdot 10^6$ м.к. на голову.

Таблица 4 – Динамика привесов у цыплят кросса «Родонит-2»

Иммунизирующая доза, млн м.к.	Средний вес цыплят в возрасте 45 суток, г	Средний вес цыплят в возрасте 57 суток, г	Среднесуточные привесы, г
0	240,4±25	208,0±22	-2,7±0,3
0,5	234,5±26	300,2±31	5,5±0,6
1	256,0±28	299,3±29	3,7±0,3
2	278,0±30	303,7±33	1,8±0,2

Патоморфологические исследования показали, что у всех неиммунизированных цыплят отмечались значительные поражения сердца (фибринозный плевроперикардит) и печени (токсическая дистрофия). В группе цыплят, иммунизированных $5 \cdot 10^5$ м.к., 50% не имели патологических изменений со стороны сердца и 75% не имели патологических изменений со стороны печени. У цыплят, иммунизированных более высокими дозами, частота патологических изменений сердца и печени увеличивалась дозозависимо. Положительная динамика среднесуточных привесов и результаты патоморфологического исследования свидетельствуют о том, что иммунизирующая доза $5 \cdot 10^5$ м.к. на голову достаточна для защиты цыплят от колибактериоза и при этом не оказывает негативного влияния на физиологические показатели.

Для оценки иммуногенных свойств вакцины определяли содержание в крови цыплят цитокинов IL-1, IL-4, IL-6, INF γ , TNF α через 11 дней после иммунизации (таблица 5).

Таблица 5 – Концентрация цитокинов в сыворотке крови цыплят иммунизированных штаммом *E. coli* Б-5 в дозе $5 \cdot 10^5$ м.к. на голову

Группы цыплят	Цитокины				
	IL-1	IL-4	IL-6	INF γ	TNF α
Контроль	118,8±10	11,1±1	12,8±1	42,9±5	10,7±1
Опыт	550,2±58	19,3±2	28,7±3	110,2±10	28,5±3

Показано, что вакцина стимулирует выработку цитокинов IL-1, IL-4, IL-6, INF γ , TNF α . Таким образом, установлена эффективность, безвредность, антитоксический эффект, протективные свойства вакцины против колибактериоза кур.

Влияние различных субпопуляций лейкоцитов на выделение трансаминаз клетками печени белых мышей *in vitro*

В рамках изучения влияния метаболического статуса на устойчивость организма животного к инфекциям, и учитывая, что основным источником ферментов, регулирующих метаболические потоки на клеточном, органном и организменном уровне, является печень, представляло интерес определить, как влияют лейкоциты различных субпопуляций на способность клеток печени выделять ферменты. Исследования проводились на модели, включающей лейкоциты и клетки печени.

Исследования проводились на нелинейных белых мышках. Животные умерщвлялись методом транслокации шейных позвонков. Из крови и селезенки разделением на градиенте фикола выделялись субпопуляции лейкоцитов. Лимфоциты выделялись в градиенте фикола 13-15%, моноциты – 17-20%, гранулоциты – 20-25%. Содержание клеток в исходных суспензиях составляло $(1,6 \pm 0,4) \cdot 10^6$ кл/мл.

Показано, что как АСТ, так и АЛТ выделяются во внешнюю среду из клеток печени, причем активность ферментов зависит от содержания в среде лейкоцитов различных субпопуляций. Наблюдалось выделение трансаминаз из не разрушенных клеток печени, что подтверждалось нулевой активностью ГГТ во всех пробах.

Общим для всех изучавшихся в опыте лейкоцитов было наличие обратной корреляции между их содержанием и активностью трансаминаз. Однако характер динамики активности ферментов существенно зависел от конкретных субпопуляций лейкоцитов (гранулоцитов, лимфоцитов, перитонеальных клеток).

Активность АСТ, выделяемая клетками печени, при последовательном уменьшении содержания гранулоцитов в суспензии незначительно возрастала (таблица 6). Суммарное повышение активности АСТ при понижении концентрации гранулоцитов с 1,60 Г/л до нуля составляет 11,85% ($p > 0,05$).

Таблица 6 – Зависимость биохимических показателей суспензии печеночного гомогената от содержания в среде гранулоцитов

Концентрация клеток Показатели	0	0,18 Г/л	0,53 Г/л	1,60 Г/л
АСТ, мккат	9,58±0,9	9,51±1,1	8,75±0,9	8,57±0,9
АЛТ, мккат	8,52±0,9	8,45±0,9	8,43±0,8	8,38±0,8
Коэффициент Де Ритиса	1,12±0,1	1,12±0,1	1,04±0,1	1,02±0,1

При внесении в среду с печеночным гомогенатом суспензии перитонеальных клеток, по мере уменьшения их содержания, активность АСТ также повышалась (таблица 7). Суммарное повышение активности АСТ при понижении концентрации перитонеальных клеток с 1,60 Г/л до нуля составляло 37,7% ($p < 0,05$).

Таблица 7 – Зависимость биохимических показателей суспензии печеночного гомогената от содержания в среде перитонеальных клеток

Концентрация клеток Показатели	0	0,18 Г/л	0,53 Г/л	1,60 Г/л
АСТ, мккат	9,58±0,9	8,20±0,9	7,62±0,7	6,96±0,6
АЛТ, мккат	8,52±0,9	8,38±0,9	8,21±0,8	7,28±0,7
Коэффициент Де Ритиса	1,12±0,1	0,98±0,1	0,93±0,1	0,96±0,1

При внесении в среду с печеночным гомогенатом суспензии лимфоцитов (таблица 8), суммарное повышение активности АСТ при понижении концентрации лимфоцитов с 1,60 Г/л до нуля составляло 43,0% ($p < 0,05$).

Таким образом, при наличии в среде с печеночным гомогенатом лимфоцитов активность АСТ была минимальна по сравнению с перитонеальными клетками и гранулоцитами, и при снижении концентрации клеток долго оставалась на сравнительно низком уровне, но при уменьшении концентрации лимфоцитов в 10 раз резко возрастала.

Таблица 8 – Зависимость биохимических показателей суспензии печеночного гомогената от содержания в среде лимфоцитов

Показатели \ Концентрация клеток	0	0,18 Г/л	0,53 Г/л	1,60 Г/л
АСТ, мккат	9,58±0,9	7,43±0,8	7,00±0,6	6,70±0,7
АЛТ, мккат	8,52±0,9	8,80±0,9	8,63±0,9	7,75±0,7
Коэффициент Де Ритиса	1,12±0,1	0,84±0,05	0,81±0,05	0,86±0,05

При наличии в среде с печеночным гомогенатом перитонеальных клеток активность АСТ по мере понижения содержания ПКМ возрастала достоверно, но более плавно, чем в случае с лимфоцитами. Вероятно, клетки печени реагируют не только на снижение концентрации перитонеальных клеток, но и на отсутствие в среде лимфоцитов.

График динамики активности АСТ при наличии в среде с печеночным гомогенатом гранулоцитов лежит выше, чем для лимфоцитов и перитонеальных клеток, и его профиль значительно отличается от профилей для агранулоцитов. В этом случае клетки печени, возможно, реагируют не только на снижение содержания гранулоцитов, но и на отсутствие в среде агранулоцитов.

Что касается АЛТ, то ее активность в среде с суспензией печеночного гомогената в ответ на уменьшение содержания лейкоцитов также возрастала, но менее выражено, чем активность АСТ. Так, в случае гранулоцитов активность АЛТ практически не изменялась. Суммарное повышение активности АЛТ при снижении концентрации перитонеальных клеток с $1,6 \cdot 10^9$ кл/л до нуля составляло 17% ($p > 0,05$). Активность АЛТ в среде с суспензией печеночного гомогената при снижении концентрации лимфоцитов с 1,60 до 0,18 Г/л возрастала на 13,6% ($p > 0,05$).

Характерно, что значения коэффициента Де Ритиса в среде с гранулоцитами всегда превышали 1,0. Для перитонеальных клеток и лимфоцитов коэффициент Де Ритиса был меньше единицы при любой ненулевой концентрации клеток. Это служит дополнительным подтверждением того, что в случае с гранулоцитами выброс трансаминаз из клеток печени происходит, прежде всего, как реакция на отсутствие агранулоцитов, и лишь во вторую очередь зависит от концентрации самих гранулоцитов. Следует отметить тенденцию к меньшим значениям коэффициента Де Ритиса в среде с лимфоцитами, чем в среде с перитонеальными клетками в тех же концентрациях.

Тот факт, что значения коэффициента Де Ритиса в среде с нейтрофильными гранулоцитами были выше, чем в среде с агранулоцитами, можно интерпретировать двояко. С одной стороны, это может указывать на то, что понижение содер-

жания гранулоцитов в отсутствие агранулоцитов воспринимается клетками печени (как органа, участвующего в иммунных реакциях), как более серьезная угроза гомеостазу по сравнению с понижением содержания агранулоцитов в отсутствие гранулоцитов. С другой стороны, это может указывать на более высокий порог чувствительности гранулоцитов к изменению соотношения активности аминотрансфераз за счет, вероятно, большей доли аэробных реакций в энергетическом обмене.

Полученные результаты позволяют сделать заключение, что у клеток печени, как органа, участвующего в формировании иммунного ответа, есть возможность воспринимать информацию о количественных и качественных характеристиках лейкоцитов и реагировать на нее посредством выделения в среду ферментов, в частности, трансаминаз АСТ и АЛТ.

Влияние трансаминаз *in vitro* на изменения интенсивности дыхания перитонеальных клеток морских свинок в ответ на *M. bovis* BCG

Цель экспериментов состояла в изучении влияния различных уровней активности АСТ и АЛТ на интенсивность окислительно-восстановительных реакций в перитонеальных клетках.

Методом ступенчатого высаливания белков сульфатом аммония получали обогащенные трансаминазами фракции сыворотки крови кролика (таблица 9).

Таблица 9 – Активность трансаминаз во фракциях сыворотки крови кролика, полученных при концентрации сульфата аммония 20% и 35%

Концентрация сульфата аммония, %	АЛТ, нкат	АСТ, нкат
20	416,7	105,0
35	0	263,3

Указанные фракции использовали для создания матрицы активностей АСТ и АЛТ. Фракции титровали в геометрической прогрессии со знаменателем 1/3 на 15 мМ NaCl. Матрицу активностей АСТ и АЛТ создавали, смешивая по 40 мкл полученных разведений, 20 мкл суспензии *M. bovis* BCG (20 мкг убитой сухой биомассы в 1 мл) и 900 мкл суспензии перитонеальных клеток с концентрацией $1 \cdot 10^6$ кл/мл. На 1 мл суспензии перитонеальных клеток вносили нитротетразолевым синий до финальной концентрации 0,01%, а также 0,25 мкмоль L-аспартата, 0,05 мкмоль L-аланина, 1,25 мкмоль α -кетоглутарата. Результаты НСТ-теста при добавлении к перитонеальным клеткам АСТ и АЛТ в различных сочетаниях на фоне добавления *M. bovis* BCG представлены на рисунке 3.

Установлено, что накопление формазана, отражающее дыхательную активность перитонеальных клеток, было прямо пропорционально активности АСТ и обратно пропорционально активности АЛТ. Влияние АСТ было более значительным, поскольку только при минимальной активности АСТ (0,3 нкат) накопление формазана в опыте было меньше, чем в контрольной пробе без ферментов. Кроме того, величина концентрации формазана более существенно зависела от изменения активности АСТ на фоне константной АЛТ, чем наоборот.

Результаты эксперимента показывают, что дыхательная активность лейкоцитов (на примере перитонеальных макрофагов) существенно зависит от ферментативной активности плазмы крови.

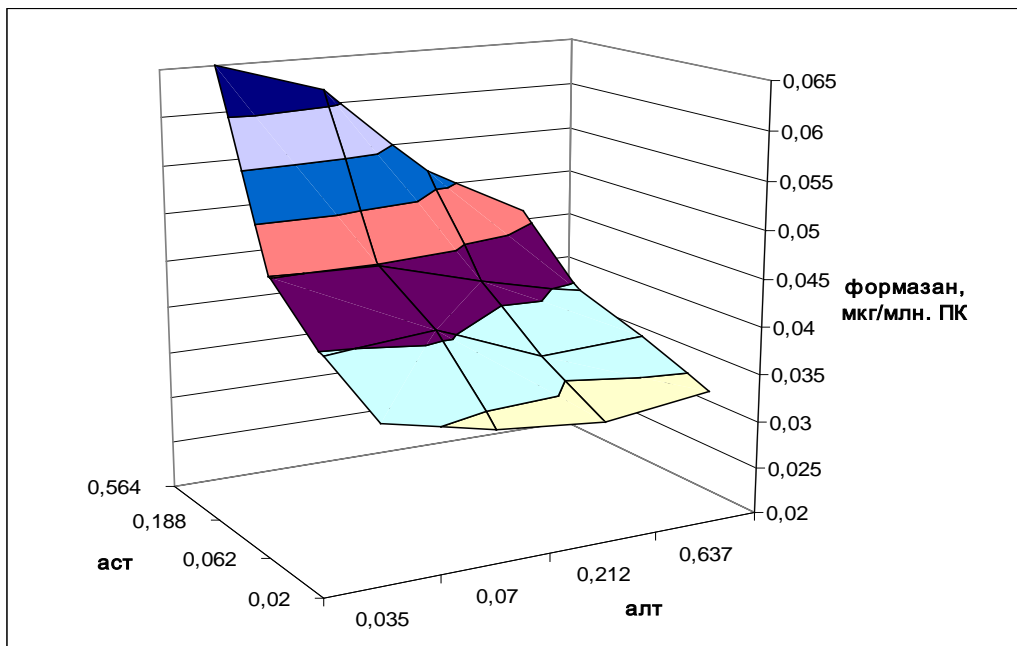


Рисунок 3 – Зависимость накопления формазана ПК морской свинки от активности АСТ и АЛТ в среде

Влияние экзогенных цитокинов *in vitro* на изменения дыхательной активности перитонеальных клеток морских свинок в ответ на *M. bovis* BCG

Лейкоциты выделяют в кровь и тканевую жидкость биологически активные вещества, в частности, цитокины. Цитокины присутствуют в крови в низких концентрациях. Поскольку коммерческие наборы реактивов, рассчитанные на определение концентрации человеческих цитокинов методом иммуноферментного анализа (ИФА), не могут гарантировать точное определение содержания цитокинов лабораторных животных, мы использовали лиофилизированные цитокины. Лиофилизаты $IFN\gamma$, $TNF\alpha$ и $IL-4$ растворяли в 15 мМ NaCl и с помощью 2-кратного титрования получали титры от 1:1 до 1:256. Получали суспензии печеночных гомогенатов в среде RPMI от интактных белых мышей. Каждую суспензию делили на аликвоты по 0,5 мл, к которым добавляли по 100 мкл титров цитокинов (контроль – 100 мкл 15 мМ NaCl). Затем доводили объем полученных суспензий до 1 мл средой DMEM. Суспензии клеток печени с цитокинами инкубировали 30 мин при 37°C, после чего в культуральных жидкостях определяли активность ферментов (таблицы 10–12).

При внесении в среду с печеночным гомогенатом $TNF\alpha$ в различных концентрациях происходило изменение активности ферментов, выделяющихся клетками печени в окружающую среду. При повышении концентрации $TNF\alpha$ до 12,6 пг/мл активность АСТ снижалась в 2,2 раза, АЛТ – в 14,4 раза, ЛДГ – в 3,4 раза; коэффициент Де Ритиса повышался в 6,6 раза.

При внесении в среду с печеночным гомогенатом $IFN\gamma$, при повышении его концентрации до 60 пг/мл активность АСТ снижалась в 4,7 раза, АЛТ – в 3,5 раза,

а активность ЛДГ не изменялась достоверно. Коэффициент Де Ритиса снижался в 1,4 раза. Как и в случае TNF α , корреляция концентрации цитокина с активностью АСТ высокая отрицательная ($r=-0,82$) (таблица 13).

Таблица 10 – Зависимость биохимических показателей от концентрации TNF α

АСТ, мккат	TNF α , пг/мл	АЛТ, мккат	Коэффициент Де Ритиса	ЛДГ, мккат
1,38 \pm 0,1	12,60	0,13 \pm 0,01	10,64 \pm 0,9	3,28 \pm 0,2
1,82 \pm 0,1	6,30	0,16 \pm 0,01	11,14 \pm 1,0	6,61 \pm 0,4
1,68 \pm 0,1	3,15	0,45 \pm 0,02	3,72 \pm 0,2	5,00 \pm 0,4
2,11 \pm 0,1	1,58	0,68 \pm 0,04	3,08 \pm 0,2	5,95 \pm 0,5
2,30 \pm 0,1	0,39	0,79 \pm 0,05	2,92 \pm 0,2	7,07 \pm 0,5
2,60 \pm 0,1	0,10	1,78 \pm 0,1	1,46 \pm 0,1	5,78 \pm 0,7
3,01 \pm 0,2	0,01	1,87 \pm 0,1	1,61 \pm 0,1	11,33 \pm 1,0

При внесении в среду с печеночным гомогенатом IL-4 эффект был похож на IFN γ , но имелись и отличия. Так, при повышении концентрации IL-4 до 30 пг/мл активность АСТ и АЛТ снижалась в 2,4 раза, а активность ЛДГ, коэффициент Де Ритиса не изменялся достоверно. Как и в случае IFN γ , корреляция концентрации IL-4 с активностью АСТ высокая отрицательная ($r=-0,81$), с АЛТ значительная отрицательная ($r=-0,61$).

Таблица 11 – Зависимость биохимических показателей от концентрации IFN γ

IFN γ , пг/мл	АСТ, мккат	АЛТ, мккат	Коэффициент Де Ритиса	ЛДГ, мккат
60,00	0,96 \pm 0,1	0,15 \pm 0,01	6,39 \pm 0,5	31,71 \pm 2,1
30,00	1,67 \pm 0,1	0,14 \pm 0,01	12,23 \pm 1,1	26,88 \pm 2,0
15,00	1,94 \pm 0,1	0,17 \pm 0,01	11,28 \pm 1,0	26,01 \pm 2,1
7,50	2,34 \pm 0,2	0,17 \pm 0,01	13,52 \pm 1,1	25,13 \pm 2,0
1,88	3,43 \pm 0,2	0,26 \pm 0,02	12,94 \pm 1,2	24,99 \pm 1,9
0,47	3,46 \pm 0,3	0,37 \pm 0,03	9,36 \pm 0,9	25,54 \pm 1,7
0,01	4,54 \pm 0,3	0,52 \pm 0,03	8,76 \pm 0,6	31,52 \pm 3,1

Таблица 12 – Зависимость биохимических показателей от концентрации IL-4

IL-4, пг/мл	АСТ, мккат	АЛТ, мккат	Коэффициент Де Ритиса	ЛДГ, мккат
30,00	1,20 \pm 0,1	0,14 \pm 0,01	8,77 \pm 0,7	16,38 \pm 1,4
15,00	0,90 \pm 0,1	0,17 \pm 0,02	5,21 \pm 0,4	1,29 \pm 1,1
7,50	1,51 \pm 0,1	0,13 \pm 0,01	11,64 \pm 0,9	12,33 \pm 1,2
3,75	2,22 \pm 0,2	0,15 \pm 0,01	14,60 \pm 1,2	12,86 \pm 1,2
0,94	2,58 \pm 0,2	0,23 \pm 0,02	11,13 \pm 1,0	13,57 \pm 1,4
0,23	3,48 \pm 0,2	0,33 \pm 0,02	10,48 \pm 0,9	12,90 \pm 1,1
0,01	2,88 \pm 0,1	0,33 \pm 0,02	8,70 \pm 0,7	15,39 \pm 1,3

Таблица 13 – Коэффициенты Пирсона для цитокинов и биохимических показателей

Цитокин	АСТ	АЛТ	Коэффициент Де Ритиса	ЛДГ
TNF α	-0,76 \pm 0,2 ¹⁾	-0,75 \pm 0,2 ¹⁾	+0,91 \pm 0,1 ¹⁾	-0,67 \pm 0,3 ¹⁾
IFN γ	-0,82 \pm 0,2 ¹⁾	-0,54 \pm 0,3	-0,16 \pm 0,3	+0,25 \pm 0,3
IL-4	-0,81 \pm 0,2 ¹⁾	-0,61 \pm 0,3	-0,40 \pm 0,3	-0,14 \pm 0,4

Примечание – 1) $p < 0,05$.

По воздействию на клетки печени в плане элюции ферментов цитокины IFN γ и IL-4 очень похожи друг на друга, но значительно отличаются от TNF α . TNF α относится к цитокинам первого поколения и, как таковой, вероятно, в меньшей степени влияет на активность АСТ и АЛТ, чем IFN γ и IL-4, относящиеся к цитокинам второго поколения. Впрочем, между IFN γ и IL-4 имеются не только сходства, но и различия. Они касаются, прежде всего, активности ЛДГ, которая в случае IFN γ в 2 раза выше, чем для IL-4 (таблица 14).

Показана обратная зависимость концентрации цитокинов IFN γ , TNF α , IL-4 и активности АСТ. Если бы в этой модели присутствовали лейкоциты – продуценты цитокинов, то рост АСТ при низких концентрациях цитокинов должен был бы простимулировать метаболическую активность лейкоцитов.

Таблица 14 – Средние значения биохимических параметров в зависимости от цитокина

Цитокин	АСТ, мккат	АЛТ, мккат	Коэффициент Де Ритиса	ЛДГ, мккат
TNF α	2,14 \pm 0,2	0,94 \pm 0,2	4,23 \pm 1,3	6,77 \pm 0,8
IFN γ	2,55 \pm 0,3	0,29 \pm 0,1	9,87 \pm 1,0	27,32 \pm 1,2
IL-4	2,23 \pm 0,3	0,22 \pm 0,03	10,44 \pm 0,9	12,20 \pm 1,4

Результаты эксперимента подтверждают наше предположение о том, что рост активности АСТ в суспензии печеночного гомогената с лейкоцитами происходит в рамках стимулирующего воздействия клеток печени на лейкоциты. С другой стороны, снижение активности АЛТ, наблюдаемое нами во многих случаях, является, вероятно, результатом воздействия лейкоцитов (посредством цитокинов) на клетки печени. Таким образом, увеличение коэффициента Де Ритиса, приводящее к росту устойчивости организма к инфекционной нагрузке за счет смещения метаболического акцента в сторону катаболизма, происходит одновременно за счет увеличения активности АСТ и уменьшения активности АЛТ. В свою очередь, повышение устойчивости организма к инфекционной нагрузке является результатом слаженного взаимодействия лейкоцитов, клеток печени и ферментов крови и их взаимного влияния друг на друга.

Влияние ЛПС различных изолятов *Pseudomonas aeruginosa* на метаболическую активность клеток печени и перитонеальных клеток белых крыс

В экспериментах использовали перитонеальные клетки белых крыс (ПКК). ПКК ресуспендировали в среде DMEM до $6 \cdot 10^6$ кл/мл с добавлением нитротетразолевого синего до финальной концентрации 0,01%. К аликвотам суспензии ПКК объемом по 0,9 мл добавляли растворы ЛПС (по 0,1 мл) изолятов *P. aeruginosa* 4, 8 (вирулентные), 11, 12, 14 (авирулентные). Финальные концентрации ЛПС в суспензиях клеток составляли 4 мкг/мл; в качестве контроля использовали 15 мМ NaCl.

Суспензии ПКК с ЛПС инкубировали 2 ч при 37 $^{\circ}$ C. По окончании времени инкубации каждую пробу делили на две аликвоты. В первых аликвотах определяли накопление формазана ПКК в НСТ-тесте. Вторые аликвоты центрифугировали, осадки клеток отмывали 15 мМ NaCl, ресуспендировали в 500 мкл среды DMEM и

добавляли к 500 мкл суспензий печеночного гомогената в среде RPMI. Пробы инкубировали в течение 30 мин при 37°C, после чего центрифугировали (3000 g, 10 мин). В супернатантах определяли активность трансаминаз АСТ и АЛТ.

При добавлении ЛПС как вирулентных, так и авирулентных изолятов накопление формазана перитонеальными макрофагами было больше, чем в контроле ($p < 0,05$), но у авирулентных – на 6,7%, а у вирулентных – на 30,4% в среднем (таблица 15).

Таблица 15 – Результаты НСТ-теста для ПК крысы

Культуры	Контроль	Вирулентные изоляты	Авирулентные изоляты
Формазан, нг/10 ⁶ ПКК	22,4±0,1	29,2±0,1	23,9±0,1

Таким образом, ЛПС всех изучавшихся изолятов *P. aeruginosa* в низкой концентрации оказывали стимулирующее действие на дыхание перитонеальных клеток крысы, причем для вирулентных изолятов эффект был в 4,5 раза выше, чем у авирулентных.

При биохимическом исследовании было установлено, что активность АЛТ в экстракте печеночного гомогената под влиянием перитонеальных клеток, обработанных ЛПС, проявляет тенденцию к снижению, причем для ЛПС вирулентных изолятов это снижение несколько более выражено. Впрочем, в обоих случаях снижение активности АЛТ было недостоверным и не превышало 17% (таблица 16).

Таблица 16 – Влияние ПКК на выделение трансаминаз клетками печени *in vitro*

Параметры	Контроль	Вирулентные изоляты	Авирулентные изоляты
АСТ, мккат	2,93±0,3	0,75±0,1	2,81±0,3
АЛТ, мккат	4,60±0,4	3,83±0,4	3,94±0,3
Коэффициент Де Ритиса	0,64±0,04	0,19±0,1	0,72±0,1
ЛДГ, мккат	27,10±2,5	18,16±2,0	9,98±1,0

Активность АСТ в случае ЛПС вирулентных изолятов снижалась на 74% ($p < 0,05$), а в случае ЛПС авирулентных изолятов практически не изменялась.

Коэффициент Де Ритиса для ЛПС вирулентных изолятов снижался на 70% ($p < 0,05$), а для ЛПС авирулентных изолятов – повышался на 14% ($p > 0,05$).

Активность ЛДГ в экстракте печеночного гомогената под влиянием перитонеальных клеток, обработанных ЛПС, снижалась ($p < 0,05$), причем для ЛПС авирулентных изолятов снижение ЛДГ превышало 60%, а для вирулентных изолятов составляло 33%.

Полученные данные позволяют говорить о том, что ЛПС синегнойной палочки в зависимости от вирулентности изолятов по-разному влияет на клетки макроорганизма.

В перитонеальных клетках ЛПС повышает дыхательную активность. Ферментативный профиль трансаминаз, выделенных клетками печени в среду в присутствии перитонеальных клеток, обработанных ЛПС, различен в зависимости от вирулентности изолятов. В случае ЛПС авирулентных изолятов *P. aeruginosa* отличия от контроля были незначительны. В то же время, при использовании ЛПС

вирулентных изолятов *P. aeruginosa* коэффициент Де Ритиса снижался по сравнению с контролем в 3,4 раза, активность АСТ – в 3,9 раза, активность АЛТ – в 1,2 раза.

Таким образом, реакция перитонеальных клеток на внесение в среду ЛПС различных изолятов *P. aeruginosa* коррелировала с вирулентностью последних. Активность трансаминаз также зависела от вирулентности изолятов синегнойной палочки. Под воздействием ЛПС вирулентных изолятов в большей степени изменялась активность АСТ, а под воздействием ЛПС авирулентных изолятов – активность АЛТ. При добавлении ЛПС авирулентных изолятов дыхательная активность перитонеальных клеток увеличивалась, но ненамного, и в присутствии таких перитонеальных клеток несколько увеличивался коэффициент Де Ритиса, причем за счет снижения АЛТ.

При проведении корреляционного анализа с вычислением коэффициентов Пирсона была выявлена значительная обратная корреляция между интенсивностью дыхания перитонеальных клеток и активностью АСТ в экстракте печеночного гомогената под влиянием тех же перитонеальных клеток, которая составила $r=-0,64$. При этом корреляция между интенсивностью дыхания перитонеальных клеток и значениями коэффициента Де Ритиса составила $r=-0,60$, а между интенсивностью дыхания ПЧК и активностью АЛТ – $r=-0,18$. Таким образом, добавление к печеночному гомогенату ПЧК, уже активированных с помощью ЛПС вирулентных изолятов *P. aeruginosa* и демонстрирующих высокую дыхательную активность, приводит к существенному снижению коэффициента Де Ритиса в экстракте печеночного гомогената за счет уменьшения активности АСТ. Напротив, добавление ПЧК с ЛПС авирулентных изолятов не оказывало существенного влияния на трансаминазный профиль экстракта печеночного гомогената.

Влияние метаболического статуса на восприимчивость крупного рогатого скота к туберкулезу

Туберкулез относится к малоконтагиозным заболеваниям, в развитии которых большую роль играет состояние макроорганизма. Нами были проведены биохимические исследования сыворотки крови коров. На момент исследования все животные были здоровы. В дальнейшем у части из них результаты туберкулиновой пробы были положительными (группа Р), других – отрицательными (группа Н). Результаты биохимических исследований и их статистической обработки представлены в таблице 17.

Таблица 17 – Биохимический анализ сыворотки крови коров, реагировавших (группа Р) и не реагировавших (группа Н) на туберкулин

Параметры	Группа Р	Группа Н
ГТТ, мккат	0,24±0,01	0,22±0,03
Общий белок, г/л	61,04±1,1 (p<0,05)	54,34±2,8
Альбумины, г/л	30,60±1,5	30,45±0,9
Глобулины, г/л	30,44±2,0 (p<0,05)	23,89±2,5
Альбумин/Глобулин	1,03±0,1 (p<0,05)	1,33±0,1
Мочевина, ммоль/л	6,42±0,3	6,31±1,2
Мочевая кислота, мкмоль/л	104,32±9,4 (p<0,05)	64,68±4,2
Общий белок / Мочевина	159,81±4,6	171,26±37,1

Животные обеих групп достоверно различались по концентрации общего белка, глобулинов и мочевой кислоты.

При проведении корреляционного анализа были выявлены высокие значения коэффициента Пирсона, отраженные в таблице 18.

Таблица 18 – Результаты корреляционного анализа

Параметры	Коэффициенты Пирсона	
	Группа Р	Группа Н
Глобулины/Мочевина	+0,996	-0,17
Общий белок/ Глобулины	+0,67	+0,95
ГГТ/Общий белок	-0,99995	-0,06
Мочевина/Мочевая кислота	-0,01	-0,97

Было установлено, что у коров, не реагировавших на РРД туберкулин (группа Н), концентрация общего белка в плазме крови была ниже, чем в группе Р ($p < 0,05$). При этом в обеих группах этот параметр не выходил за границы физиологической нормы. В то же время, обнаружена тенденция к более высоким значениям соотношения общего белка и мочевины в группе Н. Более низкая концентрация общего белка на фоне более высоких значений соотношения общего белка и мочевины указывает на снижение интенсивности белкового обмена.

По концентрации альбуминов группы Р и Н практически не различались. Таким образом, более высокая концентрация общего белка в группе Р целиком определялась более высоким содержанием глобулинов.

При проведении корреляционного анализа было установлено наличие достоверной высокой положительной корреляции ($r = +0,95$) между концентрацией общего белка и глобулинов у животных группы Н. Это указывает на закономерное изменение концентрации общего белка за счет глобулиновой фракции в этой группе. Корреляционное отношение h для общего белка и глобулинов в данной группе коров оказалось равным 0,98, а для глобулинов и общего белка 0,87. Такие показатели указывают на зависимость этих двух параметров друг от друга, близкую к линейной. Это подтверждается и коэффициентами детерминации R^2 , равными 0,99 и 0,93 соответственно. Вариация концентрации общего белка на 99% обусловлена варьированием концентрации глобулинов. Это соответствует очень высокой степени взаимозависимости концентрации общего белка и глобулинов в сыворотке крови коров группы Н. Характерно, что у животных группы Р корреляция между концентрацией общего белка и глобулинов была ниже порога достоверности.

Концентрация мочевины в обеих группах была очень сходна. Однако корреляционный анализ выявил высокую положительную корреляцию между концентрацией мочевины и глобулинов у коров группы Р ($r = +0,996$); $h_{(глобулины/мочевина)} = 0,95$, $h_{(мочевина/глобулины)} = 0,98$. Коэффициенты детерминации R^2 равны 0,98 и 0,99 соответственно. Такие показатели указывают на линейный, прямой характер зависимости этих двух параметров друг от друга. Таким образом, вариация концентрации мочевины на 99% зависит от варьирования концентрации глобулинов. Это позволяет говорить об очень высокой степени взаимозависимости концентрации глобулинов и мочевины в сыворотке крови коров группы Р. Для коров группы Н

такая закономерность отсутствует ($r=-0,17$). Поскольку в организме млекопитающих мочевины является главным компонентом остаточного азота, это также указывает на преимущественный катаболизм глобулинов в группе Р.

Корреляция между активностью ГГТ и концентрацией общего белка в сыворотке крови более выражена у коров группы Р ($r= -0,99995$). В этой группе $h_{(ГГТ/белок)}= 0,80$, а $h_{(белок/ГГТ)}= 0,91$. Такие показатели указывают на обратный характер зависимости этих двух параметров друг от друга, несколько отличающийся от линейного. Это подтверждается и коэффициентами детерминации, равными 0,89 и 0,95 соответственно, что позволяет говорить об очень высокой степени взаимозависимости концентрации общего белка и активности ГГТ в сыворотке крови коров, положительно реагирующих на туберкулин. Характерно, что у животных группы Н корреляция между концентрацией общего белка и активностью ГГТ отсутствует ($r= -0,06$). Более выраженная зависимость концентрации общего белка от активности ГГТ находит объяснение в значении ГГТ как основного маркера функциональных нарушений печени.

Корреляция между концентрацией мочевины и мочевой кислоты в сыворотке крови, напротив, более выражена у коров группы Н ($r= -0,97$); $h_{(мочевина/мочевая кислота)}=0,98$, а $h_{(мочевая кислота/мочевина)}=0,99$. Линейный обратный характер зависимости этих двух параметров друг от друга подтверждается коэффициентами детерминации, равными 0,99 и 0,997 соответственно. Это позволяет говорить об очень высокой степени обратной взаимозависимости концентрации мочевой кислоты и мочевины в сыворотке крови коров, не реагирующих на туберкулин. Характерно, что у положительно реагирующих на введение препарата РРД животных корреляция между концентрацией мочевой кислоты и мочевины отсутствует ($r= -0,01$).

Несмотря на различные попарные корреляционные связи концентрации общего белка, мочевой кислоты и мочевины в группах реагирующих и не реагирующих на туберкулин животных, корреляционная зависимость всех этих трех параметров друг от друга в обеих группах очень высока и мало различается: для реагирующих на введение туберкулина животных коэффициент Пирсона $r_{(общий белок, мочевины, мочевая кислота)}=0,97$, для не реагирующих животных $r_{(общий белок, мочевины, мочевая кислота)}=0,98$.

Таким образом, ряд биохимических показателей животных коррелирует с устойчивостью к туберкулезу.

Взаимодействие туберкулина с иммунной системой лабораторных животных

Целью настоящих исследований было изучение возможности получения антител на конъюгаты туберкулина с наночастицами золота и влияния данных конъюгатов на клетки ретикулоэндотелиальной системы лабораторных животных.

Для получения поликлональных антител на туберкулин конъюгат антигена с золотыми наночастицами вводили кроликам породы шиншилла внутримышечно четырехкратно с интервалом 14 суток в дозе 7,5 мкг антигена на голову. Кровь у животных на наличие антител отбирали спустя 10 суток после четвертой инъекции. Животным контрольной группы вводили не конъюгированный с золотыми наночастицами туберкулин в аналогичной дозе.

Титр антител в сыворотке крови определяли с помощью ИФА с применением меченных пероксидазой хрена антикроличьих антител (Карпищенко, 2002).

Иммунизацию морских свинок проводили в трех группах животных. Животным первой группы подкожно в три точки вводили нативный туберкулин, второй – конъюгат туберкулина с золотыми наночастицами, третьей – 15 мМ NaCl. Через 15 суток проводили заражение животных введением подкожно полевого изолята *M. bovis* в ожидаемой летальной дозе.

Специфичность полученных антител определяли методом иммунодот-анализа. Использовали клетки *M. bovis* вакцинного штамма BCG, *M. phlei* и *M. smegmatis*. Клетки микроорганизмов фиксировали ацетоном. Из фиксированной культуры готовили микробную взвесь с концентрацией $1 \cdot 10^9$ м.к./мл и наносили на мембрану «Western S». Проводили блокировку мембраны с нанесенным на нее антигеном 2% обезжиренным сухим молоком в фосфатном буфере, в течение 1 ч. Мембрану инкубировали в растворе антисывороток, разведенных до концентрации 1 мкг/мл 10 мМ фосфатным буфером, в течение ночи при $+4^\circ\text{C}$. Затем мембрану отмывали от неспецифически связавшихся антител и погружали в конъюгат золотых наночастиц с вторичными антителами ($A_{520}=0.5$).

При изучении влияния туберкулина на дыхательную активность клеток в качестве контроля использовали 100 мкл клеточных суспензий в 1 мл питательной среды. В опыте к 100 мкл клеточных суспензий добавляли раствор туберкулина до конечной концентрации 7,5 мкг/мл в 1 мл питательной среды с антигеном. Итоговая концентрация клеток составила $2 \cdot 10^7$ кл/мл.

Для определения бактерицидной активности фагоцитов в суспензии фагоцитов ($1 \cdot 10^6$ кл/мл) вносили туберкулин. Клетки инкубировали при 37°C в течение трех часов, после чего в каждую пробу вносили суспензию живых бактерий *E. coli* Б-5 из расчета 25 КОЕ на один фагоцит. Пробы инкубировали при $+4^\circ\text{C}$ в течение 30 мин. После инкубации и центрифугирования (1000 g, 10 мин) клетки дважды отмывали раствором Хенкса. Из каждого образца проводили высеивание на плотную питательную среду для определения степени адгезии микроорганизмов.

Титр полученных сывороток у всех кроликов в результате иммунизации конъюгатами туберкулина с золотыми наночастицами составил 1:1024. В сыворотке крови животных контрольной группы, которым вводили неконъюгированный туберкулин, антител к нему не обнаружили. Предел детекции туберкулина с использованием полученной кроличьей сыворотки, определенный методом дот-анализа, составил 0,78 мкг. При дот-анализе бактериальных клеток микобактерий детектировали 200-400 м.к./мкл в случае положительной реакции.

Для определения видовой специфичности полученных поликлональных сывороток изучали перекрестные реакции антител на туберкулин у *M. bovis* и атипичных микобактерий *M. phlei* и *M. smegmatis*. Установлено (рисунок 4), что полученные антитела давали частичный перекрест с *M. smegmatis* в больших концентрациях ($2,5 \cdot 10^8$ м.к./мл и выше). Перекрест антител с *M. phlei* в иммунодот-анализе не обнаружен.

На следующем этапе исследований применяли полученные антитела для проведения микроскопии микобактерий. На рисунке 5 приведены данные трансмиссионной электронной микроскопии при выявлении антигенных детерминант на клеточной поверхности микобактерий полученными нами антителами. Видно, что данный антиген диффузно распределен по всей поверхности микобактерий.

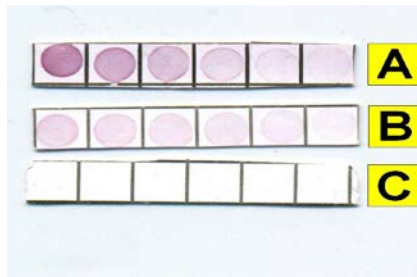


Рисунок 4 – Дот-анализ микобактерий с использованием поликлональных антител на туберкулин (A – *M. bovis*; B – *M. smegmatis*; C – *M. phlei*). Выявление проводили с использованием конъюгатов антикроличьих антител с золотыми наночастицами

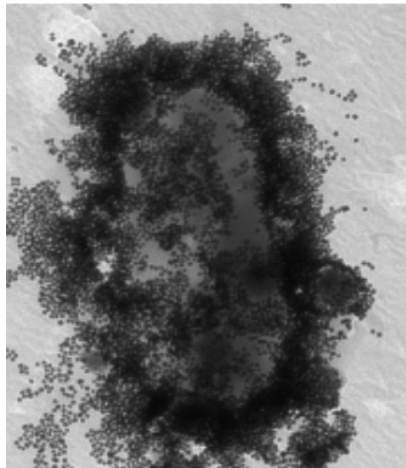


Рисунок 5 – Трансмиссионная электронная микроскопия: выявление туберкулинового антигена на клетках *M. bovis* BCG. Выявление проводили с использованием конъюгатов антикроличьих антител с золотыми наночастицами

После проведения электронной микроскопии мы изучили возможность применения полученных нами антител для иммунохимического обнаружения микобактерий в препаратах при использовании световой микроскопии. На рисунке 6 показаны препараты *M. bovis* вакцинного штамма BCG.

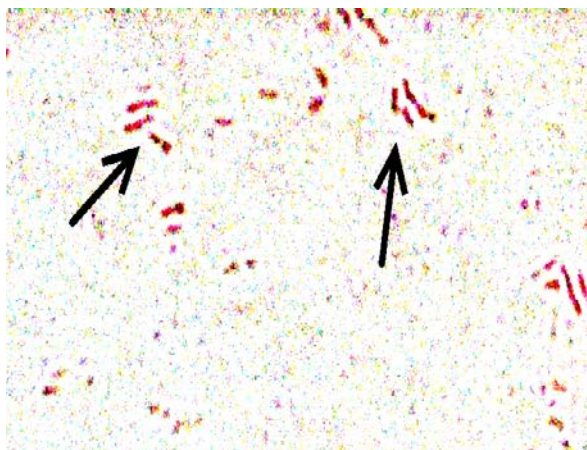


Рисунок 6 – Световая микроскопия: выявление туберкулинового антигена на клетках *M. bovis* BCG. Выявление проводили с использованием конъюгатов антикроличьих антител с золотыми наночастицами (стрелкой отмечены клетки микобактерий)

В рамках изучения воздействия туберкулина на иммунокомпетентные клетки макроорганизма представлялось важным выяснить, происходит ли проникновение туберкулина в клетки, или он остается на поверхности клеток.

Нами изучалось взаимодействия туберкулина, меченого флуоресцеинизотиоцианатом (ФИТЦ), с перитонеальными и лимфоидными клетками (рисунки 7, 8).

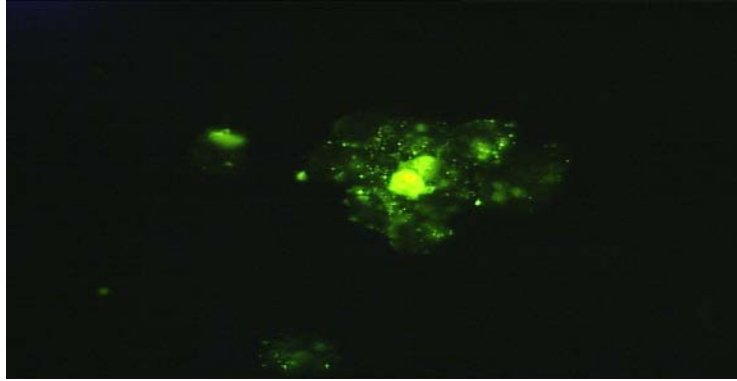


Рисунок 7 – Клетки селезенки, культивированные в присутствии туберкулина, меченого флуоресцеинизотиоцианатом (ФИТЦ; зеленое свечение)

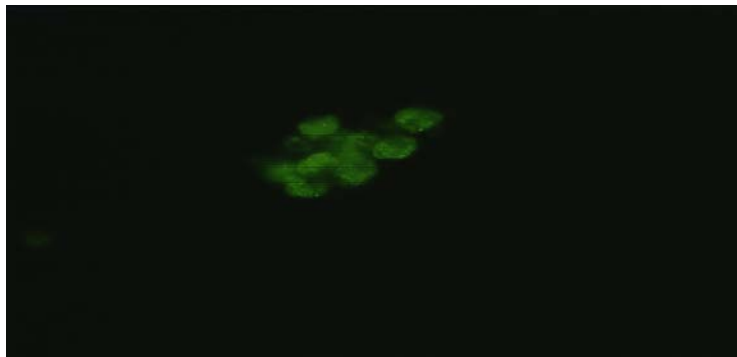


Рисунок 8 – Перитонеальные клетки, культивированные в присутствии туберкулина, меченого ФИТЦ (зеленое свечение)

Флуоресцентное свечение отмечалось как в лимфоидных, так и в перитонеальных клетках, т.е. туберкулин взаимодействовал с обоими пулами клеток иммунной системы животных. Возможность проникновения туберкулина в клетки изучалась нами при помощи конфокальной микроскопии (рисунки 9, 10).

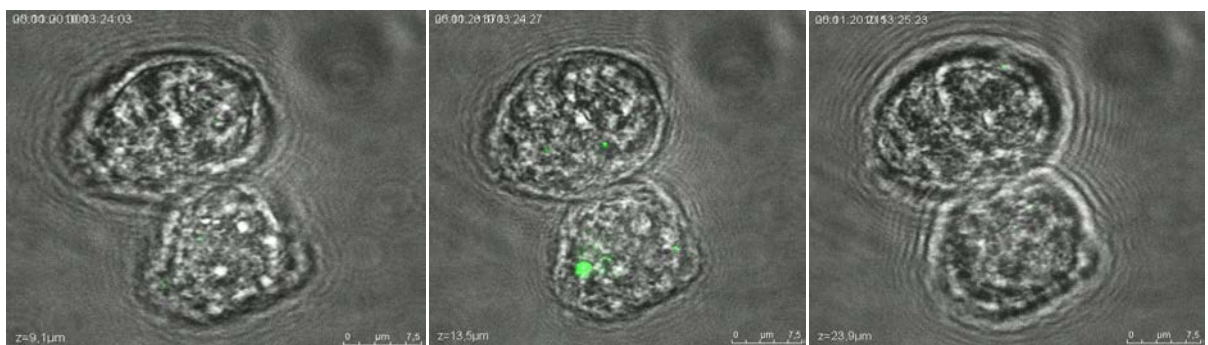


Рисунок 9 – Конфокальная микроскопия клеток селезенки, культивированных с туберкулином, меченным ФИТЦ (зеленое свечение)

Туберкулин, меченный ФИТЦ, проникал как в ПК, так и в лимфоциты, однако интенсивность флуоресценции в лимфоидных клетках была ниже, чем в перитонеальных. Это указывало на более интенсивном проникновении туберкулина, меченного ФИТЦ, в ПК по сравнению с лимфоидными клетками.

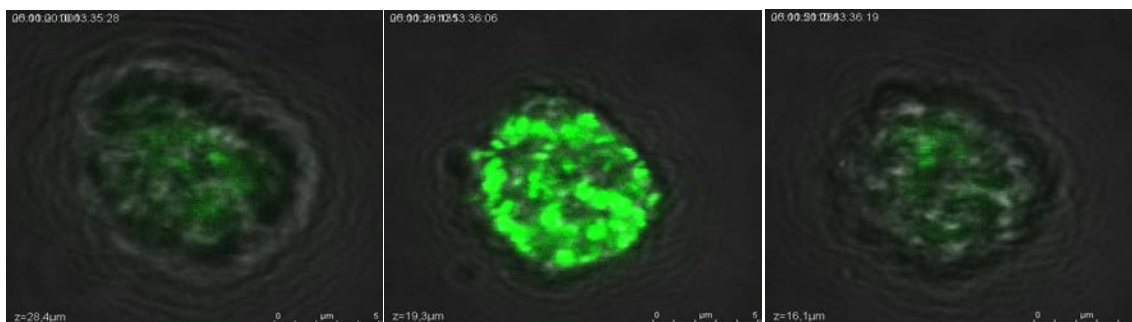


Рисунок 10 – Конфокальная микроскопия перитонеальных клеток, культивированных с туберкулином, меченным ФИТЦ (зеленое свечение)

Туберкулин, вероятно, проникает в фагоцитирующие и нефагоцитирующие клетки при помощи различных механизмов, через различные рецепторы. Мы провели конъюгирование туберкулина с золотыми наночастицами и изучили эффект проникновения конъюгатов в фагоцитирующие и лимфоидные клетки. Золотые частицы, имея размер около 15 нм, могут проникать в макрофаги при помощи фагоцитоза, а в нефагоцитирующие клетки – при помощи эндоцитоза.

На следующем этапе исследования мы изучали цитотоксическое действие туберкулина и его конъюгата с золотыми наночастицами на фагоцитирующие и нефагоцитирующие клетки. Оказалось, что туберкулин вызывает резкое угнетение дыхательной активности перитонеальных клеток. Концентрация восстановленного формазана в НСТ-тесте в ПК в опыте составляла $0,25 \pm 0,05$ мкг/мл, что значительно ниже, чем в контроле ($2,9 \pm 0,05$ мкг/мл) (рисунок 11). На нефагоцитирующие клетки селезенки туберкулин не оказывал заметного цитотоксического действия, концентрация восстановленного формазана в опыте и контроле составила $3,70 \pm 0,0$ мкг/мл и $3,74 \pm 0,04$ мкг/мл, соответственно (рисунок 12).

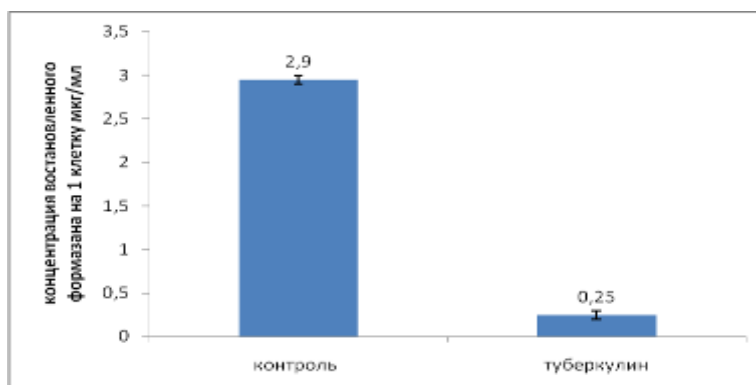


Рисунок 11 – Концентрация формазана в перитонеальных клетках в тесте с нитротетразолевым синим ($P \leq 0,05$)

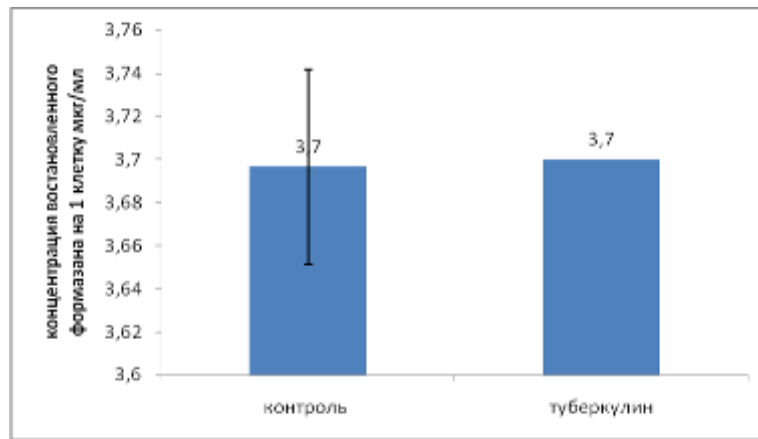


Рисунок 12 – Концентрация формазана в клетках селезенки в НСТ-тесте

В противоположность нативному туберкулину, цитотоксический эффект конъюгата туберкулина с золотыми наночастицами на фагоциты не отмечался; концентрация восстановленного формазана составляла в этом случае $3,1 \pm 0,02$ мкг/мл (см. рисунок 13), что указывало даже на некоторый стимулирующий эффект.

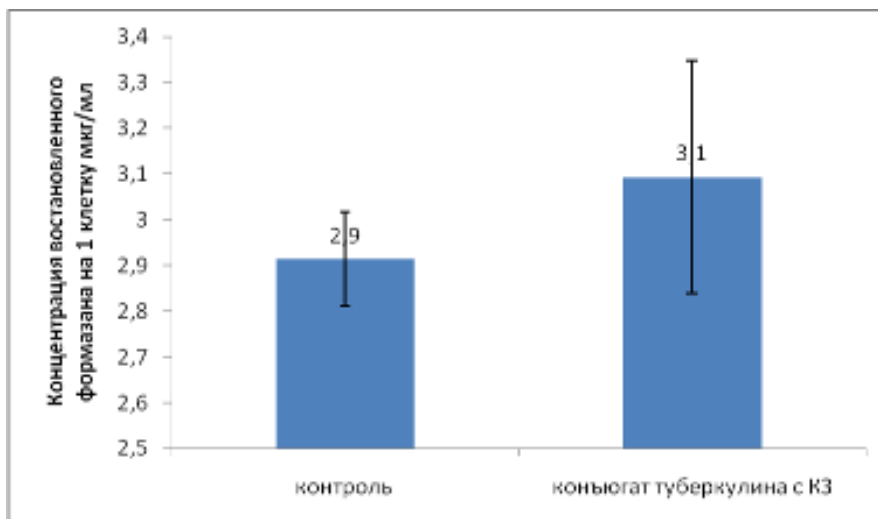


Рисунок 13 – Концентрация формазана в перитонеальных клетках в тесте с нитротетразолевым синим

Проникновение конъюгатов туберкулина с золотыми наночастицами в клетки селезенки вызывало двукратное угнетение их дыхательной активности, концентрация восстановленного формазана составляла $1,90 \pm 0,06$ мкг/мл (см. рисунок 14).

Следующим этапом нашей работы было изучение адсорбционной активности перитонеальных макрофагов крыс после их взаимодействия с туберкулином и конъюгатом КЗ-туберкулин (рисунок 15).

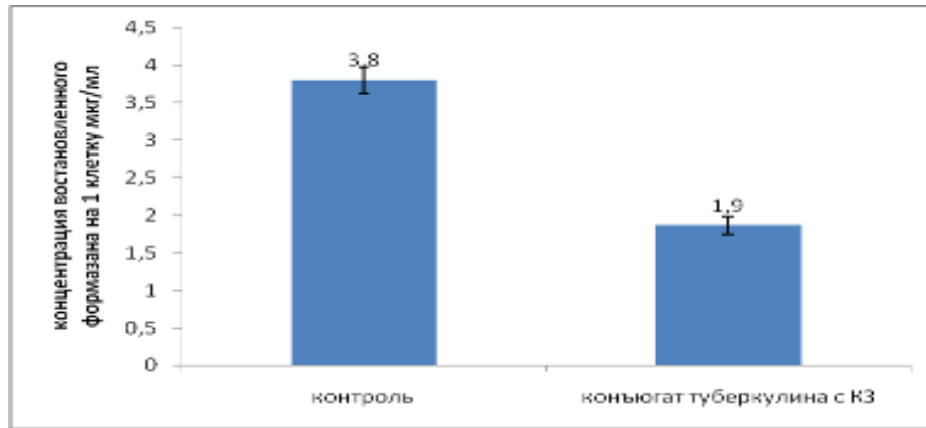


Рисунок 14 – Концентрация формазана в клетках селезенки в тесте с нитротетразоловым синим ($P \leq 0,05$)

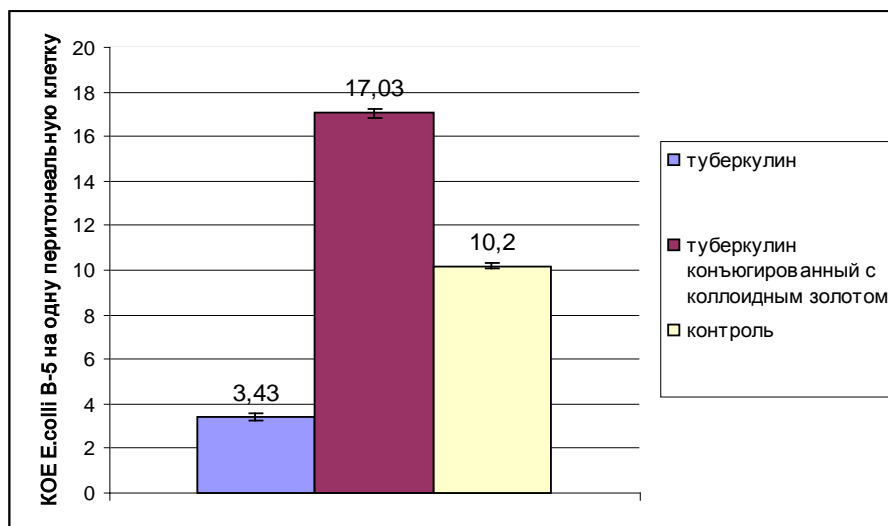


Рисунок 15 – Адсорбция клеток *E. coli* Б-5 на перитонеальные клетки, КОЕ *E. coli* Б-5 на одну перитонеальную клетку

Показано, что конъюгаты туберкулина с золотыми наночастицами усиливают адгезию фагоцитирующими клетками микробных тел; количество микроорганизмов на один фагоцит составляет $17,03 \pm 0,2$. При культивировании фагоцитирующих клеток с туберкулином вместе со снижением клеточного дыхания также наблюдается и снижение адгезивной активности; концентрация микроорганизмов на один фагоцит составляет $3,43 \pm 0,16$.

Мы провели исследования по иммунизации морских свинок конъюгатом туберкулина с золотыми наночастицами. Результаты приведены в таблице 19.

Таблица 19 – Результаты иммунизации морских свинок

	Контроль	Туберкулин	Конъюгат туберкулина с золотыми наночастицами
Появление гранулемы (сутки)	8	8	18
Появление абсцесса (сутки)	35	35	60
Время гибели от заражения, (сутки)	67	68	110
Смертность, %	100	100	70

Иммунизации морских свинок туберкулином при последующем заражении вирулентным полевым изолятом *M. bovis* не оказывала влияния на время появления гранулем, абсцессов, время гибели и общую смертность.

При заражении вирулентным полевым изолятом *M. bovis* животных, предварительно иммунизированных конъюгатом туберкулина с золотыми наночастицами, время от заражения до появления гранулем увеличивалось на 125%, от заражения до появления абсцессов – на 71%, от заражения до гибели – на 64%, смертность снижалась на 33%.

Возможность получения антител на антигены, входящие в состав туберкулина, имеет значение как с научной, так и с практической точек зрения. В частности, термостабильные белки, входящие в состав данного препарата, могут обладать биоактивными свойствами. Т.к. в большинстве случаев данные белки являются слабыми иммуногенами, в начальной стадии наших исследований мы поставили перед собой задачу определить способность самого туберкулина вызывать выработку антител при иммунизации с использованием золотых наночастиц как носителя антигена.

Клетки микобактерий, выявляемые поликлональными антителами к туберкулину и контрастируемые антикроличьими антителами, конъюгированными с золотыми наночастицами, при световой микроскопии обнаруживаются как полиморфные палочки, окрашенные в красный цвет. Данный метод может в дальнейшем служить для обнаружения микобактерий в различных объектах окружающей среды и быть хорошим дополнением к уже имеющимся методам окраски. Кроме того, при использовании специфических антител данный метод позволяет проводить дифференциальную диагностику микобактерий.

Оставался открытым вопрос о локализации конъюгата туберкулина с золотыми наночастицами в фагоцитирующих клетках. При микроскопическом исследовании взаимодействия перитонеальных клеток с конъюгатом, меченным ФИТЦ, мы обнаружили зеленое свечение, что указывало на возможность проникновения антигена во внутриклеточное пространство. Для уточнения локализации конъюгата (мембранной или внутриклеточной) мы использовали конфокальную лазерную микроскопию. Оптические срезы продемонстрировали проникновение золотых наночастиц в цитоплазму макрофагов.

При изучении цитотоксического действия туберкулина на фагоцитирующие и нефагоцитирующие клетки оказалось, что туберкулин вызывает резкое угнетение дыхательной активности перитонеальных макрофагов. На нефагоцитирующие клетки селезенки туберкулин не оказывал заметного цитотоксического действия.

Цитотоксический эффект конъюгата туберкулина с золотыми наночастицами на фагоциты не отмечался. Напротив, наблюдался некоторый стимулирующий эффект. Проникновение же конъюгатов в клетки селезенки вызывало угнетение их дыхательной активности.

Для уточнения вопроса о влиянии угнетения дыхательной активности фагоцитирующих клеток туберкулином на их способность захватывать и метаболизировать чужеродные антигены нами изучалась адсорбционная активность перитонеальных клеток крыс после их взаимодействия с туберкулином и конъюгатом туберкулина с золотыми наночастицами. Показано, что конъюгаты усиливают адгезию фагоцитирующими клетками микробных тел на 67%. При культивировании

фагоцитирующих клеток с туберкулином параллельно снижению интенсивности клеточного дыхания наблюдается снижение адгезивной активности на 66%.

Исходя из полученных результатов, мы можем сделать следующие предположения. Золотые наночастицы, проникая во внутриклеточное пространство, частично снимают токсический эффект туберкулина на перитонеальные макрофаги крыс, что способствует более активному развитию гуморальной реакции и выработке антител на туберкулин. Это делает возможным использование золотых наночастиц в качестве носителя для получения антител на вещества, обладающие токсическим эффектом.

Выводы

1. Разработан новый биохимический показатель – индекс ферментемии (ИФ) – интегрирующий соотношения энергетический/пластический обмен и аэробное/анаэробное окисление углеводов. Определены референтные значения ИФ для лабораторных животных, КРС и цыплят различных кроссов. Установлены видовые особенности значений ИФ в норме и при различных инфекционных процессах.

2. Показано, что референтные значения ИФ у лабораторных животных коррелируют с видовой устойчивостью к туберкулезу. При заражении цыплят кросса «Родонит-2» смесью вирулентных штаммов *E. coli* происходит достоверное снижение значений ИФ у интактных и дозозависимое увеличение у иммунизированных против колибактериоза особей. Выявлены достоверные различия в значениях ИФ у желтогорлых мышей из оптимальных и пессимальных естественных биотопов, коррелирующие с показателями активности иммунной системы на клеточном уровне.

3. Установлено, что сыворотка крови цыплят, иммунизированных живыми бактериями штамма *E. coli* Б-5, нейтрализуют токсинсодержащий материал вирулентных для птиц штаммов *E. coli* №388 (O2) и *E. coli* №389 (O78), продуцирующих термостабильный токсин, и изолята *E. coli* №1, продуцирующего термолабильный токсин. Выявлена способность сыворотки крови иммунизированных цыплят к образованию *in vitro* иммунокомплексов с токсинами исследованных вирулентных для птиц культур *E. coli*. Антитела к ЛПС исследуемых штаммов *E. coli* в сыворотке крови не обнаружены.

4. Показано, что в системе *in vitro* «клетки печени – лейкоциты» белых мышей выявляются АСТ и АЛТ, причем активность ферментов зависит от содержания в среде лейкоцитов различных субпопуляций. В аналогичных системах *in vitro* для клеток печени мышей и гранулоцитов, лимфоцитов, перитонеальных клеток выявлена обратная корреляция между концентрацией клеток и активностью трансаминаз. При действии на клетки печени белых мышей различных концентраций экзогенных интерлейкинов IL-4, TNF α , IFN γ дозозависимо снижается активность АСТ и АЛТ.

5. Обнаружено, что в системе *in vitro* «перитонеальные клетки – белковые фракции сыворотки крови морской свинки с различным уровнем активности трансаминаз» дыхательная активность клеток прямо пропорциональна активности АСТ и обратно пропорциональна активности АЛТ по данным НСТ-теста.

6. Установлено, что ЛПС пяти изученных изолятов *P. aeruginosa* в низкой концентрации стимулировали *in vitro* дыхательную активность перитонеальных

клеток белых крыс; при действии ЛПС вирулентных изолятов значения НСТ-теста были достоверно выше, чем при действии ЛПС авирулентных.

7. Туберкулин РРД в низких концентрациях снижает *in vitro* фагоцитарную активность перитонеальных макрофагов белых крыс в отношении микобактерий, а в высоких концентрациях угнетает как активность макрофагов, так и размножение микобактерий в питательных средах. В присутствии РРД туберкулина дозозависимо подавляется рост культуры и дыхание клеток *E. coli* Б-5.

8. РРД туберкулин, меченный ФИТЦ, *in vitro* проникает в перитонеальные макрофаги более интенсивно, чем в лимфоциты кроликов. Конъюгирование РРД туберкулина с золотыми наночастицами восстанавливает дыхательную активность перитонеальных макрофагов по сравнению с действием исходного препарата и усиливает адгезию фагоцитами микобактерий.

9. Разработана технология получения конъюгата антител к РРД туберкулину с золотыми наночастицами. Данный препарат позволяет выявлять микобактерии при световой микроскопии мазков-отпечатков из органов и патологического материала, а также в мазках из культур, выращенных на питательных средах.

ПРАКТИЧЕСКИЕ ПРЕДЛОЖЕНИЯ

1. Для оценки устойчивости и восприимчивости животных к бактериальным инфекциям, в частности, к инфекциям, вызываемым вирулентными культурами *E. coli*, *P. aeruginosa*, *M. bovis*, рекомендуется определять ряд биохимических показателей, таких как активность ферментов АСТ, АЛТ, КК, ЛДГ, КФ, концентрация липопротеидов высокой и низкой плотности, мочевой кислоты.

2. Для защиты цыплят от колибактериоза, вызываемого токсигенными штаммами *E. coli*, рекомендуется применять вакцину на основе штамма *E. coli* Б-5.

3. Для изучения взаимодействия различных звеньев иммунной системы животных с токсичными и слабоиммуногенными веществами бактериального происхождения рекомендуется конъюгирование продуктов жизнедеятельности бактерий с золотыми наночастицами.

4. Антитуберкулиновые антитела, конъюгированные с золотыми наночастицами, могут быть рекомендованы для лабораторной диагностики туберкулеза методами световой и электронной микроскопии.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

Публикации в изданиях рекомендованных ВАК РФ

1. Малинин М.Л. Биохимические и гематологические показатели у цыплят кросса «Родонит-2» в норме и при инфицировании эшерихиями / М.Л. Малинин // Вестник Саратовского госагроуниверситета им. Н.И. Вавилова. – 2008. – №3. – С. 34-38.

2. Половые различия по биохимическим показателям крови у разных видов лабораторных животных / М.Л. Малинин, Е.И. Тихомирова, Л.Б. Обух и др. // Известия Саратовского университета. Серия «Химия. Биология. Экология». – 2008. – Т. 8, Вып. 1. – С. 51-54.

3. Малинин М.Л. Особенности формирования иммунитета к колибактериозу цыплят при введении бактерий штамма *E. coli* Б-5 / М.Л. Малинин, В.Н. Ласкавый, Е.И. Тихомирова // Естественные и технические науки. – 2009. – №2. – С. 89-92.
4. Малинин, М.Л. Характеристика свойств различных вирулентных для птиц штаммов *E. coli* и их способности продуцировать токсины / М.Л. Малинин, Е.И. Тихомирова, К.П. Габалов // Фундаментальные исследования. – 2009. – №4. – С. 34-38.
5. Биохимические и гематологические показатели у мышей при введении ЛПС *Azospirillum brasilense* Sp245 / А.А. Фомина, М.Л. Малинин, Е.И. Тихомирова и др. // Токсикологический вестник. – 2009. – №6. – С. 52-53.
6. Кияшко В.В. Сравнительный анализ биохимических показателей крови желтогорлых мышей из разных мест обитания / В.В. Кияшко, М.Л. Малинин, Е.И. Тихомирова // Естественные и технические науки. – 2009. – №6. – С. 76-82.
7. Разработка иммунозолотых диагностических систем для идентификации возбудителя туберкулеза *in situ* / С.А. Староверов, И.В. Видяшева, А.С. Фомин, О.А. Василенко, М.Л. Малинин и др. // Российский ветеринарный журнал. Мелкие домашние и дикие животные. – 2011. – № 2. – С. 29-32.
8. Изучение механизмов токсического воздействия туберкулина РРД на клетки иммунной системы лабораторных животных / Фомин А.С., М.Л. Малинин, О.А. Василенко и др. // Ветеринарная патология. – 2011. – №3 (37). – С. 76-82.
9. Влияние липополисахаридов различных изолятов *Pseudomonas aeruginosa* на печень и перитонеальные клетки белых крыс / К.П. Габалов, Т.Н. Тарасенко, М.Л. Малинин [и др.] // Известия Саратовского университета. Серия «Химия, Биология. Экология». – 2011. – Т. 11, Вып. 2. – С. 98-100.
10. Малинин, М.Л. Влияние субпопуляций лейкоцитов на выделение трансаминаз клетками печени белых мышей/ М.Л. Малинин, К.П. Габалов, В.Н. Ласкавый// Ветеринарный врач. – 2013. – № 2. – С. 46-50.

Патенты РФ

1. Способ оценки устойчивости организма животного к туберкулезу: Патент № 2352938 РФ / В.Н. Ласкавый, М.Л. Малинин. Патентообладатель: Государственное научное учреждение Саратовский научноисследовательский ветеринарный институт Российской академии сельскохозяйственных наук. Опубликовано 20.04.2009. Бюл. № 11.
2. Способ оценки физиологического состояния организма цыплят: Патент № 2399203 РФ / Ласкавый В.Н., Малинин М.Л. Патентообладатель: Государственное научное учреждение Саратовский научноисследовательский ветеринарный институт Российской академии сельскохозяйственных наук. Опубликовано 20.09.2010. Бюл. № 26.
3. Вакцина против колибактериоза кур: Патент № 2404803 РФ / В.Н. Ласкавый, Э.Д. Джавадов, М.Л. Малинин М.Л. и др. Патентообладатель: Государственное научное учреждение Саратовский научноисследовательский ветеринарный институт Российской академии сельскохозяйственных наук. Опубликовано 27.11.2010. Бюл. № 33.
4. Добавка к питьевой воде для кур и способ ее применения: Патент № 2422041 РФ / В.Н. Ласкавый, С.И. Иваненко, В.И. Фисинин, В.И. Сергеев, В.М.

Стремоусов, В.И. Панферов, М.Л. Малинин и др. Патентообладатель: Государственное научное учреждение Саратовский научноисследовательский ветеринарный институт Российской академии сельскохозяйственных наук. Опубликовано 27.11.2010. Бюл. № 33.

5. Способ оценки восприимчивости крупного рогатого скота к туберкулезу: Патент № 2452952 РФ / В.Н. Ласкавый, М.Л. Малинин, В.И. Панферов и др. Патентообладатель: Государственное научное учреждение Саратовский научноисследовательский ветеринарный институт Российской академии сельскохозяйственных наук. Опубликовано 10.06.2012. Бюл. № 16.

6. Способ оценки устойчивости крупного рогатого скота к лейкозу: Патент № 2452955 / В.Н. Ласкавый, М.Л. Малинин, А.Е. Кузнецова и др. Патентообладатель: Государственное научное учреждение Саратовский научноисследовательский ветеринарный институт Российской академии сельскохозяйственных наук. Опубликовано 10.06.2012. Бюл. № 16.

7. Способ оценки устойчивости крупного рогатого скота к туберкулезу: Патент № 2452953 РФ / В.Н. Ласкавый, М.Л. Малинин, В.И. Панферов и др. Патентообладатель: Государственное научное учреждение Саратовский научноисследовательский ветеринарный институт Российской академии сельскохозяйственных наук. Опубликовано 10.06.2012. Бюл. № 16.

Публикации в других изданиях

1. Сравнительная характеристика агломеративной способности лимфоцитов у овец и крыс / М.Л. Малинин, В.М. Стремоусов, И.В. Лумельская и др. // Ветеринарная медицина. Современные проблемы и перспективы развития: сб. материалов VI Всеросс. научно-практ. конф. – Саратов, 2006. – С. 235-237.

2. Малинин М.Л. Изменения лейкоцитарной формулы цыплят при инфицировании эшерихиями / М.Л. Малинин, В.М. Стремоусов, В.Н. Ласкавый // Актуальные проблемы ветеринарии в современных условиях: сб. материалов юбил. конф. – Краснодар, 2006. – С.182-184.

3. Влияние тимолина на иммунный статус белых крыс / И.В. Бородавкин, И.В. Лумельская, М.Л. Малинин и др. // Актуальные проблемы ветеринарии в современных условиях: сб. материалов юбил. конф. – Краснодар, 2006. – С. 392-393.

4. Малинин М.Л. Различия биохимических и гематологических показателей животных в зависимости от пола / М.Л. Малинин, В.М. Стремоусов // Ветеринарная медицина. Современные проблемы и перспективы развития: сб. материалов VII Всеросс. научно-практ. конф., 2007. – Саратов, 2007. – С. 245-249.

5. Малинин М.Л. Биохимические показатели крови интактных и инфицированных цыплят / М.Л. Малинин // Научные основы производства ветеринарных биологических препаратов: сб. материалов Междунар. научно-практ. конф. – Щелково, 2007. – С. 255-259.

6. Малинин М.Л. Биохимические показатели сыворотки крови цыплят, инфицированных эшерихиями / М.Л. Малинин // Материалы IV Междунар. конф., посвящ. 85-летию Санкт-Петербургского НИИЭМ им. Пастера и 120-летию Парижского института Пастера. – СПб, 2008. – С. 130.

7. Малинин М.Л. Биохимические и патологоанатомические аспекты эшерихиоза у цыплят кросса «Родонит-2» / М.Л. Малинин, В.М. Стремоусов, И.В. Боро-

давкин // Проблемы, задачи и пути научного обеспечения приоритетного национального проекта «Развитие АПК»: сб. материалов Всеросс. научно-практ. конф. – Новочеркасск, 2008. – С. 102-107.

8. Кияшко В.В. Оценка биохимических показателей крови желтогорлых мышей из естественных мест обитания в Саратовской области / В.В. Кияшко, М.Л. Малинин, Е.И. Тихомирова // сб. материалов Всерос. научно-практ. конф. с междунар. участием. – Киров, 2008. – Вып. 6 (Ч. 2). – С. 68-70.

9. Малинин М.Л. Использование стандартного метода определения общего белка при исследовании сыворотки крови животных / М.Л. Малинин // Успехи современного естествознания. – 2008. – №3. – С. 105-106.

10. Малинин М.Л. Триглицеридовый индекс как дополнительный показатель при оценке липидного профиля сыворотки крови животных / М.Л. Малинин // Успехи современного естествознания. – 2008. – №3. – С. 106-107.

11. Малинин М.Л. Использование агрегометра для определения бактериальных токсинов / М.Л. Малинин, Т.Н. Тарасенко // Современное состояние и перспективы развития патологии, морфологии и онкологии животных: сб. материалов Всерос. науч.-практ. конф. – Новочеркасск, 2008. – С. 167-170.

12. Малинин М.Л. Нарушения метаболизма при экспериментальном колибактериозе кур / М.Л. Малинин, М.В. Волкова, Д.С. Волков // Инновационные подходы в профилактике, диагностике и лечении зооантропонозных и метаболических болезней животных и человека в Саратовской области: сб. материалов Международного Рабочего совещания. – Саратов, 2009 – С. 44-45.

13. Влияние иммунизации цыплят кросса «Родонит-2» штаммом *E. coli* Б-5 на восприимчивость к колибактериозу / М.Л. Малинин, В.М. Стремоусов, В.И. Панферов и др. // Материалы Междунар. конф., посвященной 80-летию Самарской НИВС Россельхозакадемии. – Самара, 2009 – С. 273-275.

14. Влияние трансаминаз на изменения интенсивности дыхания перитонеальных клеток морской свинки в ответ на БЦЖ *in vitro* / К.П. Габалов, М.Л. Малинин, Т.Н. Тарасенко и др. // Ветеринарная медицина домашних животных: сб. статей. – Казань, 2010. – Вып. 7. – С. 94-97.

15. Новый подход в профилактике колиинфекции птиц / М.В. Волкова, М.Л. Малинин, В.Н. Ласкавый и др. // Вавиловские чтения: сб. материалов Междунар. Научно-практ. конф. – Саратов, 2010. – Т. 1. – С. 194-195.

16. Изучение механизма воздействия туберкулина РРД на клетки иммунной системы лабораторных животных / В.Н. Ласкавый, А.С. Фомин, М.Л. Малинин и др. // Актуальные проблемы современной ветеринарии: сб. материалов Междунар. Научно-практ. конф., посвященной 65-летию ветеринарной науки Кубани. – Краснодар, 2011. – Ч. 2. – С. 276-278.

17. Малинин М.Л. К вопросу о причинах изменения ферментативной активности при инфекционной и неинфекционной патологии / М.Л. Малинин // От теории – к практике: вопросы современной ветеринарии, биотехнологии и медицины: сб. материалов Международ. научно-практ. конференции. – Саратов, 2011. – С. 173-177.

18. Малинин М.Л. Влияние туберкулина на рост и дыхание дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* / М.Л. Малинин, К.П. Габалов, С.А. Староверов // От теории – к

практике: вопросы современной ветеринарии, биотехнологии и медицины: сб. материалов Междунароу. научно-практ. конференции. – Саратов, 2011. – С. 178-181.

19. Изучение механизмов взаимодействия туберкулина PPD с клетками иммунной системы лабораторных животных / С.А. Староверов, М.Л. Малинин А.С. Фомин и др. // От теории – к практике: вопросы современной ветеринарии, биотехнологии и медицины: сб. материалов Междунар. научно-практ. конф. – Саратов, 2011. – С. 277-281.

20. Шибаева М.А. Изменение биохимического статуса и уровня продукции провоспалительных цитокинов у мышей при подкожном введении стафилококков / М.А. Шибаева, М.Л. Малинин, Е.И. Тихомирова // От теории – к практике: вопросы современной ветеринарии, биотехнологии и медицины: сб. материалов Междунар. научно-практ. конф. – Саратов, 2011. – С. 355-360.

21. Уточнение механизмов токсического воздействия туберкулина PPD на клетки иммунной системы лабораторных животных / А.С. Фомин, С.В. Козлов, А.А. Волков, С.А. Староверов, В.С. Степанов, М.Л. Малинин [и др.] // Ветеринарная клиника. – 2011. – №11 (114). – С. 12–14.

22. Влияние ЛПС изолятов *P. aeruginosa* на печень и перитонеальные клетки крыс / К.П. Габалов, Т.Н. Тарасенко, М.Л. Малинин [и др.] // Современные проблемы и инновационные подходы к диагностике, лечению и профилактике болезней животных и птиц: сб. материалов Междунар. научно-практ. конф. – Екатеринбург, 2012. – С. 44-46.

23. Малинин М.Л. / Оценка эффективности иммунизации цыплят кросса «Родонит-2» бактериями *E. coli* // М.Л. Малинин, В.М. Стремоусов, М.В. Волкова // Современные проблемы и инновационные подходы к диагностике, лечению и профилактике болезней животных и птиц: сб. материалов Междунар. научно-практ. конф. – Екатеринбург, 2012. – С. 149-150.

24. Ласкавый В.Н. Новые подходы в решении проблемы нарушений обмена веществ у высокопродуктивных молочных коров / В.Н. Ласкавый, М.Л. Малинин, С.М. Морозов // Проблемы ветеринарной медицины в условиях реформирования сельского хозяйства: сб. материалов Междунар. юбилейной научно-практ. конф., посвященной 45-летию ГНУ Прикаспийский ЗНИВИ. – Махачкала, 2012. – С. 241-250.

25. Габалов К.П. Влияние туберкулина на рост *M. bovis* VCG в различных средах культивирования / К.П. Габалов, О.А. Галкина, М.Л. Малинин // Проблемы ветеринарной медицины и зооэкологии российского и Азиатско-Тихоокеанского регионов: сб. материалов Междунар. научно-практ. конф. – Благовещенск, 2012. – С. 87-90.