

ВЛИЯНИЕ ПРЕПАРАТА ИЗ КЛЕТОК КОСТНОГО МОЗГА ЛИСИЦ НА ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ КРОВИ ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ

Зарицкая В.В. Мандро Н.М.

ФГОУ ВПО Дальневосточный государственный аграрный университет

Институт ветеринарной медицины и зоотехнии

г. Благовещенск

Перспективным в плане иммунокоррекции является применение белковых биорегуляторов. Костный мозг - один из источников иммунокомпетентных клеток, производными которых являются белки, применяемые в качестве модуляторов для повышения резистентности организма животных [1]. В настоящее время охарактеризован гуморальный фактор костного мозга, выделенный при культивировании клеток костного мозга, и изучены его некоторые физико-химические свойства [5]. Известно, что стимулятор антигенных популяций (САП) белковой природы, активность фракций которого зависит от количества содержащегося в них белка [4]. Кроме того, важной особенностью фактора костного мозга является то, что эффект стимуляции антителообразования под влиянием надосадочной жидкости, полученной от культур клеток костного мозга, не зависит от генотипа доноров этих клеток [5]. Получение биологически активных веществ из костного мозга домашних и сельскохозяйственных животных изучено по многим направлениям. Однако костный мозг диких животных Дальнего Востока и возможность использования его биологически активных веществ изучены не достаточно. Это перспективное направление в дальнейшей работе с активной субстанцией костного мозга в создании новых препаратов для быстрой и направленной стимуляции выработки антител в организме и изучении воздействия данных препаратов на формирование иммунитета.

Цель исследований: изучить физиологические особенности влияния препарата из клеток костного мозга на показатели естественной резистентности.

Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

1. Изучить влияние испытуемого препарата из костного мозга лисиц на динамику клеточных показателей защиты организма животных.
2. Определить динамику изменения основных показателей гуморальной защиты организма под воздействием препарата из костного мозга лисиц.

Материалы и методы исследования

Работа выполнена на кафедре эпизоотологии, паразитологии и микробиологии Дальневосточного государственного аграрного университета.

Препараты готовились из костного мозга трубчатых костей лисиц.

Объектом исследования были здоровые лабораторные животные – беспородные белые мыши одной линии, находящиеся в одном физиологическом состоянии: самцы, в одной возрастной категории (4-6 месяцев), массой $18,8 \pm 0,3$ г в количестве 6 голов в каждой группе (24 головы).

Приготовление препаратов из костного мозга и их исследование выполняли по модернизированному нами методу [2]: в процессе выделения белка из клеток костного мозга лисиц, добытых охотой, после отмывания клеточных популяций избавлялись от жировой фракции, путем фильтрации костного содержимого через капроновые фильтры ГОСТ 8541-94 ТУ-17-09-182-92. Затем промывали костный мозг несколько раз средой 199. Формировали группы из контрольных и опытных животных. Животных помещали в одинаковые условия после иммунизации опытных и следили за их клинико-физиологическим состоянием до появления первого иммунного ответа на введенный антиген.

Активные белковые фракции костного мозга вводили в подушечку одной из задних конечностей мыши в различных дозах (0,015 мл, 0,025 мл и 0,035 мл на мышь). На 8-е сутки проводили оценку. Кормление мышей осуществляли в соответствии с принятой в виварии ДальГАУ схемой.

Во всех группах учитывали состояние и сохранность животных. Кровь у исследуемых животных брали методом декапитации на 8-й день после иммунизации.

Биохимические и физиологические методы исследования

Биохимический состав костного мозга исследовали по следующим методикам: общий белок – рефрактометрическим методом [3], в костномозговом растворе определяли уровень белковых фракций и иммуноглобулинов основных классов с помощью электрофореза в геле агарозы [6].

Изучали показатели резистентности мышей до иммунизации и получавших препарат из костного мозга. В этих целях исследовали состояние клеточных и гуморальных звеньев неспецифической защиты. В крови общепринятыми методами определяли: количество эритроцитов и лейкоцитов в счетной камере Горяева, лейкограмму методом микроскопии сухих фиксированных и окрашенных по методу Май-Грюнвальда мазков крови с дифференцированием различных форм лейкоцитов, фагоцитарную активность нейтрофилов

и фагоцитарный индекс по общепринятым методикам; общий белок рефрактометрическим методом [3]; белковые фракции методом электрофореза в геле агарозы [6]. Полученные экспериментальные материалы подвергнуты математическому анализу методами биометрии с определением достоверности различий Р по t-критерию Стьюдента.

Результаты исследований

Для изучения показателей клеточной защиты под воздействием препарата из костного мозга лисиц (ПКМЛ) данные гематологического исследования и показатели неспецифической резистентности мышей контрольной и опытных групп приведены в таблицах 1, 2 и 3.

Таблица 1 - Морфологические показатели крови у мышей под влиянием применения ПКМЛ в различных дозах

Группы животных х	Дозы (мл)	Морфологические показатели крови			
		эритроциты		лейкоциты	
		M±m	%	M±m	%
1	2	3	4	5	6

Продолжение таблицы 1

1	2	3	4	5	6
Контроль	—	8,36±0,13	100,0	6,09±0,07	100,0
1 опытная	0,015	8,46±0,12	101,1	6,15±0,07	100,9
2 опытная	0,025	10,15±0,07	121,4 ^{***}	8,39±0,13	137,7 ^{***}
3 опытная	0,035	8,42±0,14	100,7	6,18±0,05	101,4

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

Как видно из данных таблицы 1 интенсивность изменения в морфологическом составе крови мышей подопытных групп зависели от дозы вводимого препарата. Следует отметить, что у мышей контрольной группы и 1 и 3 опытных групп гематологические показатели практически не отличались, тогда, как у 2 опытной группы содержание эритроцитов и лейкоцитов достоверно увеличилось на 21,4% и 37,7% соответственно.

По результатам, которые отражены в таблицах 1 и 2 видно, что по сравнению с контролем, введение препарата в дозе 0,015 мл на мышью приводит к незначительному увеличению лейкоцитов на 0,9% за счет увеличения сегментоядерных нейтрофилов – на 0,4% и эозинофилов – на 3,1%, остальные же показатели практически не отличаются от таковых контроля.

Таблица 2 - Лейкограмма крови мышей до и после иммунизации ПКМЛ

Группы животных	Дозы (мл)	Палочкоядерные нейтрофилы	Сегментоядерные нейтрофилы	Моноциты	Эозинофилы	Лимфоциты
Контроль	—	8,3±0,51	47,9±1,0	2,1±0,04	3,2±0,30	38,2±0,38
		100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
1 опыт	0,015	8,3±0,11	48,1±0,16	2,1±0,17	3,3±0,18	38,2±0,20
		100,0	100,4	100,0	103,1	100,0
2 опыт	0,025	9,3±0,32	45,6±1,14	2,7±0,20	2,0±0,35	40,6±0,40
		112,0	95,1	128,5*	62,5	106,2**
3 опыт	0,035	8,7±0,40	50,7±0,37	1,6±0,13	2,7±0,07	36,2±0,56
		104,8	105,8	76,1	84,3	94,7

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

Достоверные различия с контролем мы получили по содержанию моноцитов (на 28,5%) и лимфоцитов (на 6,2%), увеличение палочкоядерных нейтрофилов на 12% статистически не подтвердилось при введении мышам препарата из костного мозга в дозе 0,025 мл на мышь, что составило увеличение лейкоцитов на 37%. Содержание сегментоядерных нейтрофилов и эозинофилов снизилось в сравнении с аналогами контроля на 4,9% и 37,5% соответственно (опытная группа 2). На 39,9% повышается ФИ, на 73,3% - ФА и на 16,6% оказался выше лимфоцитарно-нейтрофильный индекс, что подтвердилось достоверностью при статистической обработке (таблица 3).

Таблица 3 -Динамика показателей клеточной защиты мышей, иммунизированных различными дозами ПКЛМ

Группы животных	Дозы (мл)	Лимфоцитарно-нейтрофильный индекс	Фагоцитарная активность	Фагоцитарный индекс
Контроль	—	0,6±0,02	25,8±1,57	3,0±0,30
		100,0	100,0	100,0
1	2	3	4	5

Продолжение таблицы 3

1	2	3	4	5
1 опыт	0,015	0,6±0,03	29,6±1,11	3,0±0,31
		100,1	114,7	100,1
2 опыт	0,025	0,7±0,01	36,1±0,70	5,2±0,31
		116,6***	139,9***	173,3***
3 опыт	0,035	0,6±0,02	28,3±1,05	3,0±0,31

		100	109,6	100,1
--	--	-----	-------	-------

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

В 3 опытной группе (доза, вводимого препарата 0,035 мл на мышь) морфологические показатели опытных животных были больше против контрольных на 1,4% - увеличилось количество палочкоядерных и сегментоядерных нейтрофилов соответственно на 4,8% и 5,8%, зато содержание других клеток лейкограммы снизилось. Однако указанные различия статистической достоверностью не подтвердилось. Лимфоцитарно-нейтрофильное соотношение осталось практически на прежнем уровне, а вот ФА и ФИ увеличилось, хотя незначительно – на 9,6% и 0,1% соответственно, но это увеличение оказалось недостоверным.

Изучая биологическую активность нашего препарата, в дозе 0,025 мл, являющейся наиболее эффективной, выяснили следующее. Результаты наших исследований свидетельствуют о достоверном увеличении содержания общего белка в сыворотке крови опытных животных под влиянием БАП костного мозга, о чем говорят средние величины. Так по данным таблицы 5 количество белка с $49,2 \pm 0,91$ г/л увеличилось до $85,4 \pm 1,32$ г/л, т.е в 1,73 раза.

Дальнейшие наши исследования сводились к проведению электрофореза сыворотки крови испытуемых и контрольных животных в геле агарозы, т.е на количественное содержание белковых фракций. Полученные данные показаны в таблице 5, из которой следует, что большая часть белковых фракций достоверно представлена глобулинами в сравнении с общим количеством белка, меньшая альбуминами, как в сыворотки крови опытных, так и контрольных мышей. Так, у животных, не иммунизированных БАП количество глобулиновых фракций на 37,5 г/л больше, чем альбуминовых взятых от общего содержания белка. А у иммунизированных животных это разница составила 60,3 г/л ($P < 0,001$) (таблица 4).

Сравнивая полученные результаты у опытных животных по содержанию фракций белка, выяснили, что количество альбуминовых фракций увеличилось в 2,08 раз, а содержание, например, $\gamma_1 + \gamma_2$ глобулинов в 1,97 раз по сравнению с контролем ($P < 0,001$), причем наименьшее содержание в этой сумме приходится на γ_2 глобулины (таблица 4). Изучение различий между двумя выборками показателей электрофореза статистической достоверностью не подтвердилось только при подсчете β глобулинов, их оказалось больше только на 1,21 г/л (таблица 4), по остальным же показателям наблюдается достоверное увеличение белковых фракций в сравнении с аналогами контроля.

Таблица 4 - Оценка разности средних показателей, двух выборок электрофореза сыворотки крови мышей (контроль-опыт)

Показатели электрофореза г/л	Лабораторные мыши		разница показателей	p
	контроль	опыт		
1	2	3	4	5

Продолжение таблицы 5

1	2	3	4	5
Общий белок	49,5±0,91	85,4±1,32	+25,90	<0,001
Альбумины	12,0±0,64	25,0±1,41	+12,93	<0,001
α ₁ - глобулины	7,0±0,40	11,4±0,43	+4,42	<0,001
α ₂ - глобулины	7,3±0,28	11,7±0,85	+4,44	<0,001
β - глобулины	9,1±0,33	10,3±0,72	+1,21	>0,05
γ ₁ - глобулины	10,3±0,26	20,3±0,73	+10,05	<0,001
γ ₂ - глобулины	3,2±0,13	6,4±0,42	+3,28	<0,001
γ ₁ + γ ₂	13,6±0,18	26,8±0,41	+13,2	<0,001
%Σ γ ₁ + γ ₂	27,6±0,43	31,4±0,59	+4,4	<0,001

Выводы:

1. Препарат из клеток костного мозга лисиц в дозе 0,025 мл на мышь достоверно увеличивает уровень иммунокомпетентных клеток – лейкоцитов; способствует более быстрому поступлению в кровь клеток – моноцитов и лимфоцитов, продуцирующих биологически активные вещества; вызывает достоверное повышение показателей фагоцитоза, за счет увеличения фагоцитирующих клеток и повышения эффективности фагоцитарных реакций.

2. Костномозговой препарат стимулирует активность поступления белков в кровяное русло, в общем, на 73,4±12,35% включая и количество общего белка, и может быть использован с целью повышения гуморальной защиты животных.

Список литературы

1. Бударина, А.М. Цитохимические исследования лимфоцитов крови и костного мозга [Текст] /А.М. Бударина // Ветеринария. - 1980.- N 11.- С.31-32.
2. Захарова, Л.А. Физико-химическая характеристика медиатора костного мозга, стимулирующего антителогенез [Текст]/ Л.А. Захарова, А.В. Катлинский, Р.Н. Степаненко // Иммунология.- 1986.- N 3.- С.35-38.
3. Лабораторные исследования в ветеринарии: биохимические и микологические: Справочник [Текст] / сост.: Б.И. Антонов, Т.Ф. Яковлева, В.И. Дерябина; под ред. Б.И. Антонова. - М.: Агропромиздат, 1991.- С.6-7.
4. Михайлова, А.А. Иммунорегуляторные свойства миелопептида – 1 [Текст] / А.А. Михайлова, Е.А. Кирилина, С.Ю. Шанурин //Докл. АН СССР.- 1994.- Т.337.- С.553-554.
5. Хаитов, Р.М. Иммуномодуляторы: механизм действия и клиническое применение [Текст]/ Р.М. Хаитов, Б.В. Пинегин //Иммунология.- 2003. - Т.24, N 4.- С.196.
6. Чекишев, В.М. Качественное определение иммуноглобулинов в сыворотке крови животных [Текст]/ В.М. Чекишев// Метод. рекомендации Сиб. отд. ВАСХНИЛ.- Новосибирск, 1977.- 22 с.