

Действие экстрактов из эмбриональных тканей кур на мышей с экспериментальной лейкопенией

UDC 619: 636.028:616.155:615.324.038

V.G. KUZNETSOVA, G.F. ZHEGUNOV*

Effect of Extracts From Chicken Embryonic Tissues on Mice with Experimental Leucopenia

Изучали действие экстрактов из эмбриональных тканей кур на мышей с экспериментальной лейкопенией. Наблюдали восстановление количества лейкоцитов крови уже на первые сутки после их введения. Установлено, что криоэкстракты обладают более выраженным и пролонгированным действием, чем экстракты, не подвергавшиеся замораживанию.

Ключевые слова: эмбрионы кур, экстракты, криоконсервирование, лейкопения.

Вивчали дію екстрактів з ембріональних тканин курей на мишей з експериментальною лейкопенією. Спостерігали відновлення кількості лейкоцитів крові після введення екстрактів, що вивчали в першу добу після їх введення. Встановлено, що криоекстракти мають більш виражену та подовжену дію, ніж екстракти, що не заморожували.

Ключові слова: ембріони курей, екстракти, криоконсервування, лейкопенія.

The effect of extracts derived from embryonic tissues of chickens on mice with experimental leucopenia was studied. The recovery of the number of blood leucocytes even at the first 24 hrs after their introduction was observed. It has been found that cryoextracts possessed more manifested and prolonged effect versus the ones non-frozen.

Key-words: chicken embryos, cryopreservation, leucopenia.

В ветеринарной медицине актуальна проблема профилактики и борьбы с массовыми вирусными болезнями животных, обусловленными вторичными иммунодефицитами различного происхождения, широким распространением латентного вирусного носительства, нарушением обменных процессов, ослабляющих иммунный статус организма [1]. Поэтому при лечении и для профилактики таких заболеваний, а также для снятия поствакцинальных реакций у животных большое значение придается применению иммуностимуляторов [3]. Это обуславливает необходимость разработки препаратов, корректирующих иммунный статус организма [1].

В настоящее время используются иммуностимуляторы бактериальной природы [4], а также широкий спектр препаратов из тимуса [4, 9]. Недостатками таких препаратов являются многостадийность и сложность их производства. Многие из них обладают нежелательным побочным действием и имеют множество противопоказаний [3].

В [1] отмечается, что сильным иммуностимулирующим действием обладают препараты из эмбрионов птиц, их преимуществом являются доступность технологии, а также низкий уровень побочных реакций и противопоказаний при приме-

нении [1]. Эмбриональные ткани практически не иммуногенны [7]. Эффективность некоторых биопрепаратов подтверждается результатами экспериментальных и клинических разработок [7]. Препараты также оказывают влияние на различные стороны метаболизма целостного организма, содержат клетки, способные выполнять заместительные функции [7]. Экстракты, полученные из эмбриональных тканей различных органов, после введения в организм оказывают воздействие не только на одноименные ткани, но и на другие органы и весь организм [1].

Известно, что в процессе замораживания-отогрева в тканях происходят изменения, способствующие выходу биологически активных веществ и усилению активности препаратов [6].

Цель работы – получить различные экстракты из тканей эмбрионов кур и изучить их иммуностимулирующую активность.

Материалы и методы

В работе были использованы эмбрионы 9 дней развития. Выбор данного срока был обусловлен тем, что максимальную иммунологическую активность эмбриональных тканей наблюдают именно в этот период [3].

Институт проблем криобиологии и криомедицины
НАН Украины, г. Харьков

* Автор, которому необходимо направлять корреспонденцию:
ул. Переяславская, 23, г. Харьков, Украина 61015; тел.: +38 (057) 373-31-26, факс: +38 (057) 373-30-84, электронная почта:
cryo@online.kharkov.ua

Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov, Ukraine

* To whom correspondence should be addressed: 23, Pereyaslavskaya str., Kharkov, Ukraine 61015; tel.: +380 57 373 3126, fax: +380 57 373 3084, e-mail: cryo@online.kharkov.ua

Получали четыре варианта экстрактов. После выемки яиц из инкубатора эмбрионы извлекали из скорлупы, освобождали от оболочек и отмывали изотоническим раствором хлористого натрия (рН 7,4). Далее эмбрионы взвешивали и разделяли на 2 группы. Первую группу гомогенизировали 5 мин на фосфатном буфере (рН 7,4) и изотоническом растворе хлористого натрия (1:1). Гомогенат центрифугировали при 10 000 об/мин при температуре 4°C (экстракт 1) и при 3 000 об/мин (экстракт 2). Надосадки фильтровали и хранили при температуре -196°C до применения.

Вторую группу эмбрионов сначала дважды замораживали в жидком азоте (-196°C) с последующим размораживанием на водяной бане при температуре 37-40°C. Далее эмбрионы гомогенизировали, центрифугировали и хранили, как описано выше (экстракты 3 и 4).

Лейкопению моделировали у мышей линии СВА путем внутримышечного введения 0,125 мг/г гидрокортизона натрия. Забор крови производили из хвостовой вены экспериментальных животных. Оценку активности экстрактов проводили путем подсчета количества лейкоцитов в камере Горяева [2, 5] и на мазках, приготовленных по методу Романовского [2, 5]. Исследуемые экстракты животным вводили внутримышечно спустя 24 ч после развития лейкопении. Количество лейкоцитов в крови животных определяли в течение 13 суток. Для контроля использовали изотонический раствор хлористого натрия, экстракт из мышечной ткани взрослой курицы, экстракт из различных тканей суточного цыпленка. Экстракты, используемые как контрольные, получали аналогичным способом с исследуемыми.

Всего было сформировано 15 групп животных, которым вводили: 1) экстракт 1 в концентрации 0,03 мг белка/г массы тела; 2) экстракт 1 в концентрации 0,15 мг белка/г массы тела; 3) экстракт 1 в концентрации 0,3 мг белка/г массы тела; 4) экстракт 2 в концентрации 0,03 мг белка/г массы тела; 5) экстракт 2 в концентрации 0,15 мг белка/г массы тела; 6) экстракт 2 в концентрации 0,3 мг белка/г массы тела; 7) экстракт 3 в концентрации 0,03 мг белка/г массы тела; 8) экстракт 3 в концентрации 0,15 мг белка/г массы тела; 9) экстракт 3 в концентрации 0,3 мг белка/г массы тела; 10) экстракт 4 в концентрации 0,03 мг белка/г массы тела; 11) экстракт 4 в концентрации 0,15 мг белка/г массы тела; 12) экстракт 4 в концентрации 0,3 мг белка/г массы тела; 13) эквивалентное количество изотонического раствора хлористого натрия; 14) мышечный экстракт; 15) экстракт из тканей новорожденного цыпленка.

За наиболее эффективную принимали концентрацию, после введения которой количество лейко-

цитов крови экспериментальных животных возрастало до самых высоких показателей.

Результаты и обсуждение

На рис. 1 представлены данные о влиянии экстракта 1 на скорость восстановления количества лейкоцитов в крови животных с экспериментальной лейкопенией. Так, при введении мышам экстракта в количестве 0,15 мг белка/г массы тела наблюдали быстрое повышение количества лейкоцитарных клеток до максимальных показателей на вторые сутки после введения экстракта, после чего постепенно уменьшалось количество лейкоцитов к 8 дню эксперимента до нормы. Введение экстракта 1 в количестве 0,03 мг белка/г массы тела не оказывало такого эффекта. Количество исследуемых кровяных клеток восстанавливалось до нормы только к 6 дню эксперимента. У животных, которые получали экстракт 1 в количестве 0,3 мг белка/г массы тела, количество лейкоцитов крови повышалось быстрее всего и ко 2 дню после введения экстракта соответствовало норме, но не превышало ее. У животных контрольной группы восстановление клеток происходило медленно и приходило в норму к 8 дню эксперимента. Наиболее эффективной концентрацией для экстракта 1 является 0,15 мг белка/г массы тела.

При введении экстракта 2 (рис. 2) в количестве 0,15 мг белка/г массы тела количество лейкоцитов восстанавливается уже на первые сутки. Повышенное количество клеток сохраняется до 9 суток, а затем показатели возвращаются до нормальных. При введении исследуемого экстракта в количест-

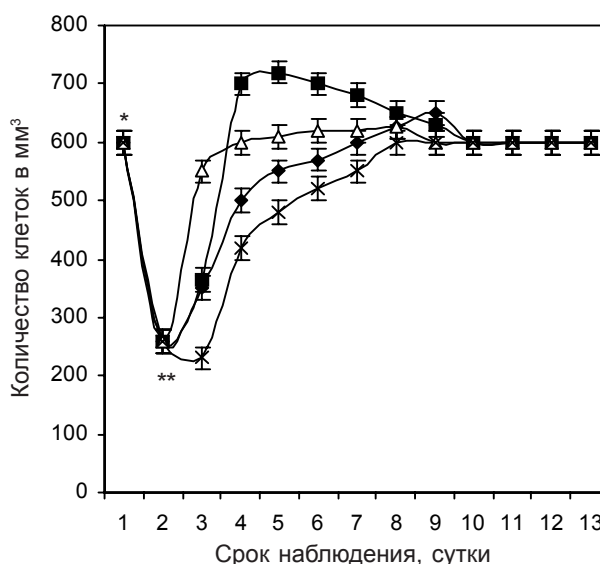


Рис. 1. Действие различных концентраций экстракта 1 на динамику восстановления лейкоцитов у животных с экспериментальной лейкопенией: ◆ — 0,03 мг белка/г массы тела; ■ — 0,15 мг белка/г массы тела; ▲ — 0,3 мг белка/г массы тела; × — NaCl; * — введение гидрокортизона натрия; ** — введение экстракта.

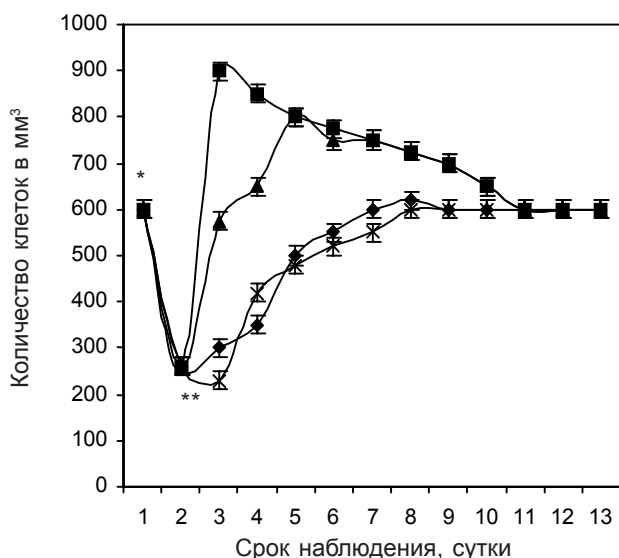


Рис. 2. Действие различных концентраций экстракта 2 на динамику восстановления лейкоцитов у животных с экспериментальной лейкопенией: ◆ – 0,03 мг белка/г массы тела; ■ – 0,15 мг белка/г массы тела; ▲ – 0,3 мг белка/г массы тела; × – NaCl; * – введение гидрокортизона натрия; ** – введение экстракта.

ве 0,30 мг белка/г массы тела также наблюдается восстановление количества лейкоцитов за 1 сутки, а далее их количество возрастает и возвращается до нормы к 10 суткам. При введении 0,03 мг белка/г массы тела эффект выражен слабее. Количество лейкоцитов постепенно повышается и приходит в норму к 8 дню эксперимента, как и у животных контрольной группы. Наиболее эффективной концентрацией для экстракта 2 является 0,15 мг белка/г массы тела.

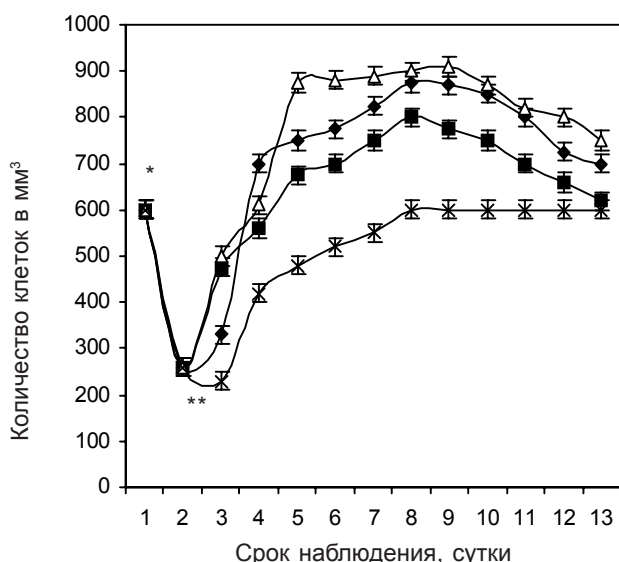


Рис. 3. Действие различных концентраций экстракта 3 на динамику восстановления лейкоцитов у животных с экспериментальной лейкопенией: ◆ – 0,03 мг белка/г массы тела; ■ – 0,15 мг белка/г массы тела; ▲ – 0,3 мг белка/г массы тела; × – NaCl; * – введение гидрокортизона натрия; ** – введение экстракта.

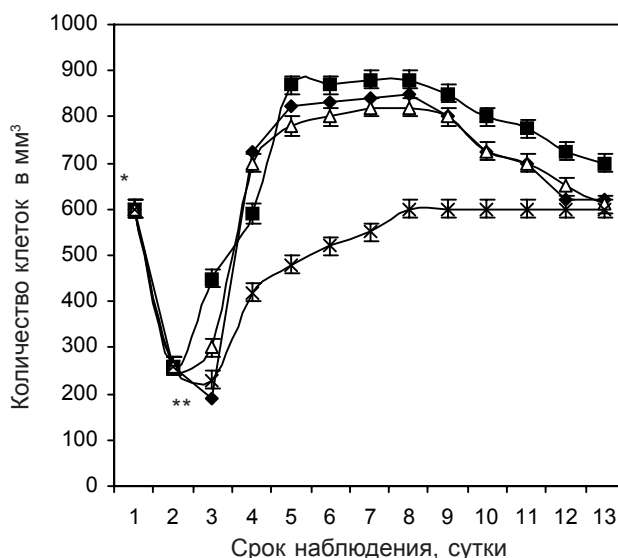


Рис. 4. Действие различных концентраций экстракта 4 на динамику восстановления лейкоцитов у животных с экспериментальной лейкопенией: ◆ – 0,03 мг белка/г массы тела; ■ – 0,15 мг белка/г массы тела; ▲ – 0,3 мг белка/г массы тела; × – NaCl; * – введение гидрокортизона натрия; ** – введение экстракта.

На рис. 3 показана динамика скорости восстановления количества лейкоцитов в крови животных после введения экстракта 3. Введение данного экстракта в количестве 0,03 мг белка/г массы тела повышает количество лейкоцитов до нормы уже на вторые сутки. Далее количество клеток продолжает увеличиваться и остается на высоком уровне до 13-х суток. При введении исследуемого экстракта в концентрации 0,15 мг белка/г массы тела мы также наблюдаем быстрое восстановление количества лейкоцитов. Далее происходит повышение количества клеток, которое сохраняется в течение 10 дней. У животных, получивших экстракт 3 в концентрации 0,3 мг белка/г массы тела, количество лейкоцитов возрастает до нормы также на 2 день после введения экстракта, далее повышается и остается на высоком уровне до конца эксперимента. Наиболее эффективной концентрацией в данном случае является 0,3 мг белка/г массы тела.

При анализе данных, полученных после введения экстракта 4 (рис. 4), нами было установлено, что восстановление количества лейкоцитов происходит подобно экстракту 3. Однако скорость восстановления лейкоцитов была выше. Наиболее эффективной концентрацией при применении экстракта 4 является 0,15 мг белка/г массы тела.

Было установлено, что биологически активные вещества из гомогенатов эмбрионов обладают выраженным иммуностимулирующим действием. После введения мышам экстрактов 3 и 4 отмечались более глубокие и стойкие изменения в крови животных. Количество лейкоцитов возрастало

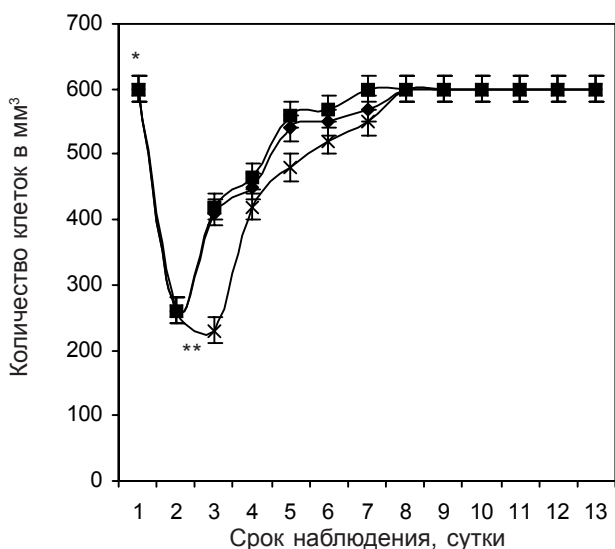


Рис. 5. Действие контрольных экстрактов на динамику восстановления лейкоцитов у животных с экспериментальной лейкопенией: \blacklozenge – 0,03 мг белка/г массы тела; \blacksquare – 0,15 мг белка/г массы тела; \blacktriangle – 0,3 мг белка/г массы тела; \times – NaCl; * – введение гидрокортизона натрия; ** – введение экстракта.

максимально, причем эффект сохранялся в течение 10–13 дней. При введении животным экстрактов, не подвергавшимся замораживанию (1 и 2), эффект развивался также быстро, однако не достигал таких же высоких показателей и был менее пролонгированным. Можно предположить, что замораживание способствует высвобождению молекул, которые несколько повышают иммуностимулирующую активность и эффективность экстрактов. Таким образом, биологически активные вещества эмбриональных экстрактов тканей кур оказывают положительное влияние на функционирование иммунной системы животных, в частности эффективно восстанавливают лейкоциты при лечении экспериментальной лейкопении.

Для контроля специфической эффективности эмбриональных экстрактов животным вводили экстракты из мышечной ткани взрослых кур и новорожденного цыпленка. На рис. 5 показано, что после введения экстрактов в количестве 0,15 мг белка/г массы тела количество лейкоцитов восстанавливается лучше, чем в контроле. Однако довольно медленно, то есть экстракты мышечной ткани взрослой курицы и новорожденного цыпленка обладают некоторым неспецифическим иммуностимулирующим действием, но не столь выраженным, как экстракты из эмбриональных тканей.

Под световым микроскопом нами был проведен анализ мазков крови, приготовленных по методу Романовского [2]. Лейкоцитарные клетки представлены преимущественно гранулоцитами (75%), а также лимфоцитами (20%). При развитии лейкопении и при введении экстрактов процентное соотношение клеток не изменяется.

Выводы

1. Все исследуемые экстракты из эмбриональных тканей кур проявляют иммуностимулирующее действие.

2. Экстракты после низкоскоростного центрифугирования более эффективны, чем экстракты, подвергшиеся центрифугированию при 10000 об/мин.

3. Действие экстрактов после замораживания более пролонгированное, чем действие экстрактов, не подвергавшихся замораживанию.

4. Наиболее эффективной для исследуемых экстрактов является концентрация 0,15 мг белка/г массы тела.

Литература

1. Глотов А.Г., Аликин Ю.С., Нефедченко А.В. и др. О некоторых механизмах иммуномодулирующего действия вестина и фагостина при ИРТ крупного рогатого скота // Пробл. стабилизации и развития сел. хоз-ва Казахстана, Сибири и Монголии.– Новосибирск, 2000.– С. 159.
2. Метелкин А.И., Утевский М.Л. Лабораторные клинические исследования.– М.: Медгиз, 1951.– 158 с.
3. Мысачева В.И., Хомов В.В., Сизов А.А. и др. Влияние препаратов на основе эмбриональных тканей кур на иммунную систему // Ветеринария.– 1995.– №11.– С. 46–47.
4. Растунова Г.А., Щербакова Э.Г., Круглова И.С. Прогидрозан как активатор перитонеальных макрофагов // Антибиотики.– 1981.– №6.– С. 524–544.
5. Сахаров П.П., Метелкин А.И., Гудкова Е.И. Лабораторные животные.– М.: Медгиз, 1952.– 283 с.
6. Филатов В.П. Консервирование по Филатову: Монография.– М.: Медгиз, 1954.– 156 с.
7. Юрченко Т.Н., Прокопюк О.С., Ломако В.В. Клеточная и тканевая трансплантация. Биопрепараты.– Харьков, 2003.– 63 с.
8. Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // Anal. Biochem.– 1976.– Vol. 72, N1-2.– P. 248–254.
9. Low T.L.K., Goldstein A.L. Thymosin and other thymic hormones and their synthetic analogues // Springer Seminars in Immunopathology.– 1979.– Vol. 2, N2.– P. 169–186.

Поступила 17.07.2008