

ВПЛИВ БІОЛОГІЧНО АКТИВНИХ БІЛКОВИХ МОЛЕКУЛ МОЛОЗИВА НА ІМУННУ СИСТЕМУ

Бородіна О.О., Заярнюк А.В., Лич І.В.

Національний університет харчових технологій, м. Київ, Україна

Вступ. Щорічно в Україні від інфекційних захворювань гине майже 20 тис. осіб, тому одним із головних питань фармацевтичної галузі є боротьба з інфекціями, що викликані стійкими до антибіотиків штамами мікроорганізмів та не піддаються стандартному лікуванню [1].

Первинне молоко, що з'являється у ссавців відразу після пологів, називається молозивом, кілька крапель якого можуть вплинути на нормальне формування імунної системи малюка. Коров'яче молозиво є досить поживним та енергетично цінним продуктом із високим вмістом біологічно активних та захисних чинників, що, в свою чергу, забезпечує надійне пристосування новонародженої дитини до умов оточуючого середовища та захист від цілої низки інфекцій [2]. Крім того, молозиво корів вважається не лише енергетично ефективним продуктом імунного харчування, а й хорошою профілактикою від вірусних захворювань. Воно допомагає нейтралізувати дію шкідливих факторів, тобто є загальнозміцнювальним та імуностимулювальним засобом, який чинить протипухлинну, протизапальну та антимікробну дію, завдяки наявності в своєму складі абзимів (каталітичних антитіл).

На сьогоднішній день абзимологія вважається новим та надзвичайно перспективним напрямком імунології та фармації в основі якого лежить дослідження та вивчення імуноглобулінів, які володіють каталітичною (абзимною) властивістю. Каталітичні імуноглобуліни несуть біологічну функцію антитіл і присутні у великій кількості в молозиві, яке секретується у ссавців для забезпечення пасивного імунітету проти вторгнення патогенів, також вони володіють антибактеріальною, противірусною та протипухлинною активностями і можуть впливати на проліферацію, диференціацію та апоптоз різних клітинних ліній. Адже з'ясовано, що білки-абзими молозива IgG та sIgA за допомогою Fab фрагментів здатні не лише зв'язуватися з патогенними мікроорганізмами та вірусами, а гідролізувати їх ДНК та РНК [3]. Саме такі специфічні властивості каталітичних імуноглобулінів слід враховувати при створенні біокаталізаторів та профілактичних медичних препаратів нового покоління проти бактеріальних та вірусних захворювань, а також препаратів для боротьби із раковими захворюваннями.

Метою нашого дослідження було вивчення та аналіз впливу суміші біологічно активних білкових молекул молозива корів на неспецифічні фактори імунної системи людини в умовах *in vitro*, а також виявлення антимікробних властивостей біологічно активних білкових фрагментів молозива.

Методи дослідження. Матеріалом дослідження є біологічно активні білкові фрагменти молозива корів. Проби з молозивом відбиралися з першого дня отелення корови і впродовж наступних 3 днів та очищали від домішок (мікроорганізми, вуглеводи та жири) з метою виділення білкових молекул відповідно до схеми (див. рисунок 1).

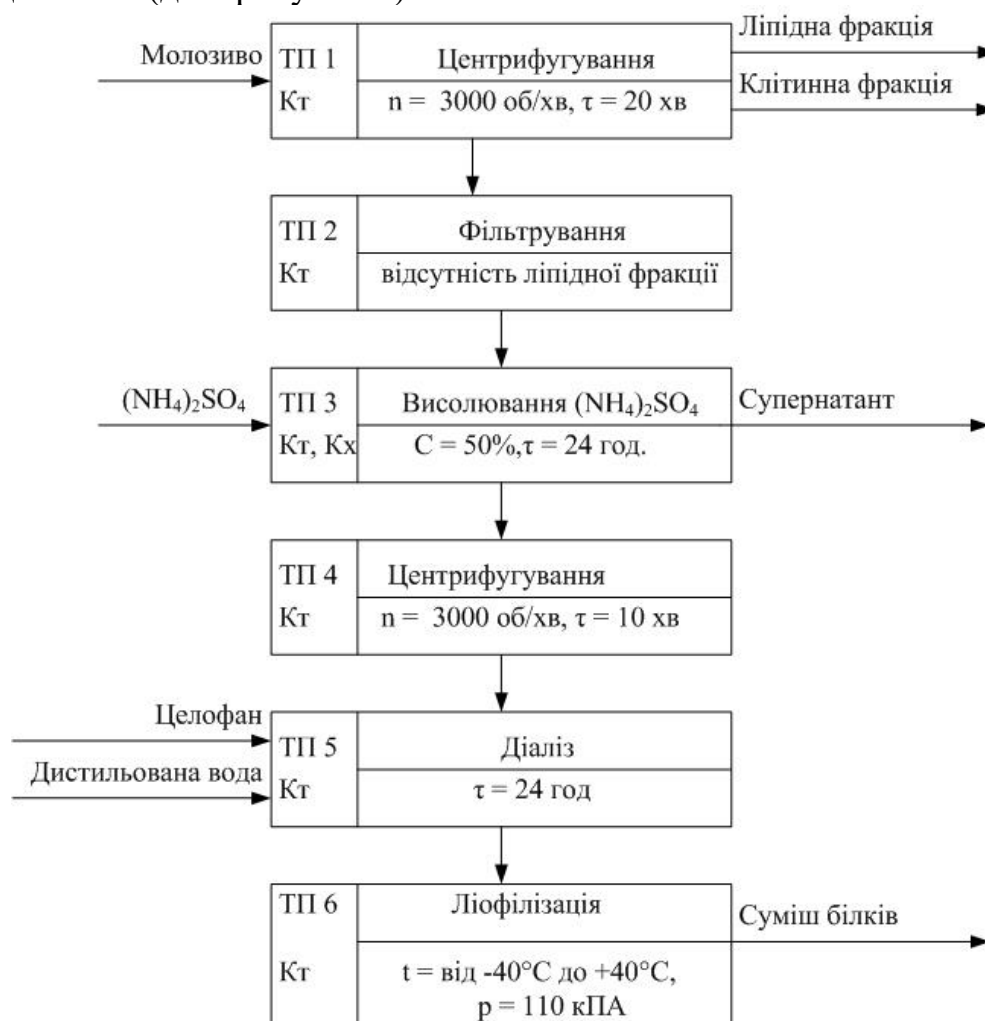


Рис. 1. Схема виділення та очищення біологічно активних білкових молекул з молозива корів

На першому етапі досліджень ми вивчали вплив білків-абзимів молозива корів на функціональну активність клітин імунної захисту. Дослідження проводили в тестах в системі *in vitro*. Відсоток фагоцитувальних клітин визначали методом поглинання часток латексу ($d=1,0 - 1,3$ мкм). Інтенсивність киснезалежного метаболізму нейтрофілів і моноцитів вивчали в НСТ-тесті (за відсотком НСТ-позитивних клітин і за цитохімічним коефіцієнтом). Для визначення розеткоутворювальних клітин використовували метод розеткоутворення з частинками, які покриті моноклональними антитілами.

Наступний етап досліджень спрямований на виявлення впливу суміші білків-абзимів на рівень експресії рецепторів на лімфоцити (Лф) периферичної крові: на Т-Лф (CD3+), В-Лф (CD22+) та на їх окремих субпопуляціях (CD4+ та CD8+). Для цього використовували метод розеткоутворення Лф з частинками, які вкриті моноклональними антитілами (МКАТ) проти CD3+ (Т-Лф), CD4+ (Т-хелпери) та CD8+ (Т-цитотоксичні/ефекторні Лф). Для визначення щільності

рецепторів на В-Лф використовували еритроцити, що вкриті МКАТ проти CD22+ після обробки Лф різними концентраціями суміші білків-абзимів.

На третьому етапі ми досліджували протимікробні властивості біологічно активних білкових фрагментів молозива корів на клітини мікроорганізмів за показником мінімальної інгібувальної концентрації (МІК). Для визначення МІК використовували метод серійних поступових двократних розведень у рідкому середовищі МПБ, який для росту бактеріальних культур є оптимальним. В якості тест-культур використовувались бактерії *Escherichia coli* IEM-1 та *Bacillus subtilis* БТ-2.

Основні результати. На першому етапі ми вивчали вплив біологічно активних білкових молекул виділених з молозива корів на функціональну активність клітин імунної захисту. У процесі наших досліджень ми виявили, що відсоток нейтрофілів, які захопили частки латексу при додатковому обробленні сумішшю білків був на 15% вище порівняно з контролем, а моноцити виявилися нечутливими до оброблення сумішшю білків і відповідно відсоток фагоцитозу залишався на рівні контролю. Досліджуючи інтенсивність киснезалежного метаболізму нейтрофілів, необхідно зазначити, що суміш білків-абзимів в концентрації 1,0 мг/мл мала стимулювальний вплив (на 30%) на кількість НСТ-позитивних клітин. Це свідчить про те, що така концентрація суміші каталітичних антитіл позитивно впливає на активність кисеньзалежного метаболізму нейтрофільних гранулоцитів (НГ). Відсоток НСТ-позитивних моноцитів, як і ЦХК збільшувався на 10% і 30% відповідно при обробленні клітин сумішшю білків-абзимів в концентрації 0,1 мг/мл. Таким чином, отримані результати можуть свідчити, про те, що абзими, завдяки своїм специфічним фізико-хімічним властивостям, можуть відігравати роль активатора певних окисно-відновних реакцій в фагоцитувальних клітинах.

Наступний етап досліджень спрямований на виявлення впливу суміші білків-абзимів на рівень експресії рецепторів на лімфоцити (Лф) периферичної крові: на Т-Лф (CD3+), В-Лф (CD22+) та на їх окремих субпопуляціях (CD4+ та CD8+). Під час дослідження нами з'ясовано, що при додаванні суміші білків-абзимів в концентрації 0,1 мг/мл кількість рецепторів до CD3+ клітин зменшилася на 9% відносно контролю, а кількість рецепторів до CD22+ навпаки збільшилася на 5%. Під впливом суміші білків-абзимів за концентрації 1,0 мг/мл кількість рецепторів до CD3+ клітин збільшилася на 20%, а до CD22+ спостерігалось зниження рівня клітин на 13%.

Під час вивчення впливу суміші каталітичних імуноглобулінів на процес розеткоутворення субпопуляції Т-лімфоцитів встановлено, що при обробленні клітин сумішшю білків в концентрації 1,0 і 0,1 мг/мл відзначалося збільшення субпопуляції CD4+ на 25% і 15% відповідно. При визначенні CD8+ (Т-цитотоксичних/ ефекторних лімфоцитів) відмічено пригнічувальний вплив білків-абзимів в концентраціях 0,1 мг/мл на 43%, а при обробленні в концентрації 1,0 мг/мл спостерігається збільшення експресії рецепторів до CD8+ на 15%. Вивчаючи зміни експресії рецепторів до еритроцитів барана (ЕБ), що вкриті моноклональними антитілами до CD4+ та CD8+ після інкубації лімфоцитів з

сумішами білків-абзимів різної концентрації, слід зазначити, що при обробленні Лф сумішню білками-абзимами в концентраціях 1,0 мг/мл та 0,1 мг/мл спостерігалось збільшення CD4+ на 27% та 24% відповідно (контроль – 22%), до CD8+ виявлено збільшення на 28% (контроль – 25%) при обробленні сумішню білків концентрацією 1,0 мг/мл. Отже, білки-абзими мали значний вплив на розеткоутворювальну здатність, як на Т-Лф (CD3+), В-Лф (CD22+) так і на їх окремі субпопуляції (CD4+ та CD8+), а ефективність експресії рецепторів залежала від концентрації оброблюваних білків-абзимів.

Третім етапом досліджень було виявлення антимікробних властивостей біологічно активних білкових фрагментів молозива корів. При дослідженні встановлено, що МІК білкових препаратів на основі молозива щодо *E. coli* ІЕМ-1 становила 39 мкг/мл, а МІК щодо *B. subtilis* БТ-2 – 160 мкг/мл. Отримані дані підтверджують чутливість наведених штамів мікроорганізмів до дії білкового препарату. Крім цього вони є більш чутливими до грамнегативних мікроорганізмів (*E. coli* ІЕМ-1), ніж до грампозитивних (*B. subtilis* БТ-2).

Висновки. Отже, у результаті наших досліджень було виявлено, що суміш білків-абзимів володіє дозозалежним імуностимулювальним ефектом на неспецифічні клітини імунної системи в умовах *in vitro*. Ці результати є перспективним матеріалом для подальшого вивчення взаємодії каталітичних антитіл з макроорганізмом в умовах *in vivo*. Отримані результати щодо антибактеріальних властивостей біологічно активних білків молозива корів дають змогу відзначити, що доведено безпосередній інгібувальний вплив білків-абзимів на клітини грампозитивних та грамнегативних мікроорганізмів.

Таким чином, наукове дослідження доводить перспективність подальшого створення протимікробних білкових препаратів природного походження на основі молозива, до яких не має резистентності та наступне вивчення ефектів абзимів на рівні макроорганізму.

Список літератури

1. Крамарєв С.О. Проблемні питання інфекційних хвороб в Україні // Здоров'я України. – 2007. – №2/1 – С. 7-8.
2. Korhonen H. J. Production and properties of health-promoting proteins and peptides from bovine colostrums and milk. //Cell. Mol. Biol. –2013 – №59 (1). – Р. 12 – 24.
3. Бунева В.Н., Красноруцкий М.А., Невинский Г.А. Природные антитела к нуклеиновым кислотам // ШАГИ профессионал. –2013. – С. 50-66.