

ОПРЕДЕЛЕНИЕ БЕЗВРЕДНОСТИ ПРИРОДНЫХ ГЛИКОПЕПТИДОВ НА ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ

Софронова О.В.¹, Полякова Л.Л.²

¹Софронова Ольга Владимировна – научный сотрудник, кандидат технических наук;

²Полякова Людмила Леонидовна – младший научный сотрудник,
лаборатория биотехнологии микроорганизмов.

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
Всероссийский НИИ физиологии, биохимии и питания животных – филиал
Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
ФНЦ Животноводства – ВИЖ им. академика Л.К. Эрнста,
пос. Институт, г. Боровск, Калужская область

Аннотация: изучение острой токсичности и аллергенности природных гликопептидов на мышах и кроликах. При современном уровне физического, химического и биологического загрязнения окружающей среды домашние и сельскохозяйственные животные в меньшей, если не в большей, степени, чем люди страдают от вторично индуцированного иммунодефицита – разбалансировки нормального функционирования иммунной системы. Это приводит к существенному снижению общей сопротивляемости организма животного к различным заболеваниям вирусной и бактериальной природы. Восстановить нормальное функционирование иммунной системы животного можно с помощью иммуномодуляторов, действующим началом которых является синтезированный из природных компонентов гликопептид – универсальный структурный фрагмент оболочки клеток молочнокислых бактерий, взаимодействующий с иммунной системой животного организма.

Ключевые слова: гликопептиды, молочнокислые бактерии, средне смертельная доза, токсичность и аллергенность.

ВВЕДЕНИЕ.

Гликопептиды повышают общую сопротивляемость организма животного к патогенному фактору, прежде всего за счет активации клеток фагоцитарной системы иммунитета (нейтрофилов и макрофагов). Последние путем фагоцитоза уничтожают патогенные микроорганизмы и, в то же время, секреторируют медиаторы естественного иммунитета – цитокины, которые, воздействуя на широкий спектр клеток-мишеней, вызывают дальнейшее развитие защитной реакции организма.

Препарат, создаваемый на основе природных гликопептидов, планируется применять для профилактики и лечения инфекционных заболеваний сельскохозяйственных и домашних животных; для снятия у них поствакцинальных осложнений и стрессового состояния.

Исследование токсических свойств синтетических и природных гликопептидов, проведенное в 70-80 – десятые годы прошлого столетия, привело к созданию ряда синтетических фармацевтических препаратов нового класса – иммуномодуляторов. Учитывая высокую токсичность синтетических гликопептидов, нами были проведены дополнительные исследования безвредности природных гликопептидов, выделенных из различных видов молочнокислых бактерий.

Проведенные исследования показали значительно более низкую токсичность и аллергенность природных гликопептидов по сравнению с синтетическими фармакопейного качества.

Аминокислотный состав гликопептидов, выделенных из одного ряда лактобактерий (палочкообразных) оказался одинаков. Начальная часть молекулы большинства природных гликопептидов – дисахарид-дипептид – GMDP (N-ацетил глюкозаминил - N'- ацетилмураamil – L – аланил – D – изоглутамин).

Целью настоящей работы является изучение токсичности и аллергенности природных гликопептидов молочнокислых бактерий на лабораторных животных.

Материалы и методы исследования.

Исследования выполнены во ВНИИ физиологии, биохимии и питания с.-х. животных в соответствии с «Инструкцией о гигиенических требованиях к новым препаратам химического и биологического синтеза, предполагаемым для использования в составе рациона или для консервации кормов сельскохозяйственных животных, продукция которых идет в пищу населения» [1, с. 230-239] (утверждена 14 декабря 1981 г) и «Методическими указаниями по определению токсических свойств препаратов, применяемых в ветеринарии и животноводстве» [2, с. 239-289].

Исследования были проведены на мышах и кроликах.

При изучении патогенности, определении средней смертельной дозы, токсичности и токсигенности гликопептидов эксперименты проводили на мышах обоего пола со стандартной живой массой тела 22-25 г.

Мышей содержали в виварии института в стандартных клетках, получали они полноценный рацион (ОР), состоящий из специального комбикорма ПК-121-1 (для лабораторных мышей и крыс) по 10 г на голову в сутки.

Определение среднесмертельной дозы. Из мышей было сформировано 4 групп по 10 особей в каждой группе. Контрольная (1-ая) группа получала – ОР, изучаемый препарат вводили с кормом в дозах – 0,05 мг/мышь (2-ая группа - рекомендуемая доза), 0,5 мг/мышь (3-я группа - десятикратная доза) и 5,0 мг/мышь (4-ая группа - стократная доза) на протяжении 7 суток, контрольная группа добавок не получала.

Аналогично проводились испытания инъекционного препарата. Из мышей было сформировано 4 группы по 10 особей в каждой (5 самок и 5 самцов). Подопытным мышам (6-8-ая группы) внутривенно инъецировали препарат в рекомендуемой, десятикратной и стократных дозах в объеме 0,5 мл, а контрольным животным (5-ая группа) вместо препарата вводили стерильный изотонический раствор хлорида натрия в дозе 0,5 мл.

За животными велись наблюдения в течение 30 суток после введения препарата, и учитывалась их сохранность, общее состояние и внешний вид.

Определение острой токсичности (LD_{50}) препарата, при введении его в желудок, было проведено на серых мышах. Десяти мышам (5 самок и 5 самцов) вместе с гранулами задавалось по 1,0 мл раствора препарата на голову с концентрацией 0,5 мг/мышь. Препарат скармливался в течение 10 дней, а наблюдение за животными велось в течение 2 недель.

Второй этап исследований токсичности гликопептида выполнен в виварии института на молодняке кроликов 2-х месячного возраста.

Для изучения токсичности кролики породы калифорнийская по принципу парных аналогов были разделены на четыре группы по шесть голов в каждой. Первая группа получала основной рацион (ОР), состоящий из 150 г разнотравного сена и 200 г полнорационных гранул. Животные 2-й, 3-й и 4-й групп дополнительно к ОР в течение 7 дней получали по 1 мл раствора препарата: 2-я группа в количестве 0,8 мг на голову (рекомендуемая доза); 3-я группа – 8 мг на голову (десятикратная доза), 4-я группа – 80 мг/голову (стократная доза).

Опыт длился 1,5 месяца. На протяжении всего опыта ежедневно осуществлялся контроль за общим состоянием животных, учитывали потребление ими кормов и проводили взвешивание кроликов и взятие крови до и после скармливания препарата [2].

Местное токсическое действие гликопептидов определяли путем нанесения раствора на кожу [1]. При постановке кожной пробы шерсть на боку выстригали на площади 6х9 см и двукратно с интервалом в 24 ч втирали в кожу раствор препарата, а контрольным животным втирали в кожу воду. Учет реакции проводили ежедневно в течение 4 суток. До и после нанесения препарата измеряли толщину кожной складки.

Для изучения аллергенных свойств препарата в опыт были взяты те же животные, на которых испытывалось местное токсическое действие на кожу (по 4 кролика из контрольной и опытной групп). Кроликам на один и тот же выстриженный участок кожи наносили путем втирания на протяжении 8 сут. раствор препарата в концентрации 0,8 мг/мл. Через 14 сут. после последней аппликации гликопептида на кожу свежевостриженного участка спины этим же животным вновь втирали препарат в той же концентрации. Учет реакции проводили через 24 ч.

Изучение раздражающего действия на конъюнктиву глаза. Для внесения раствора препарата в конъюнктивный мешок кролику оттягивали верхнее веко и закапывали из пипетки 1-2 капли раствора препарата (без твердых частиц), а контрольным кроликам идентично вводили стерильную воду. В каждой группе было по 6 кроликов. Учет реакции проводили ежедневно в течение 6 суток.

Результаты исследований и их обсуждение.

В последнее время появился интерес к иммуномодуляторам – гликопептидам, как синтетическим, так и натуральным, выделенным из различных молочнокислых бактерий. В 1974 г. F. Lederer и др. [3, с. 1317-1320] нашли, что такие сравнительно небольшие по молекулярному весу соединения такие как мурамилдипептид (MDP), обладает такими же иммуномодулирующими свойствами как адьювант Фрейда, что привело к производству новых иммуномодуляторов на его основе.

Одновременно болгарские ученые выделили биологически активные соединения из лизоцимного гидролизата клеток *Lactobacillus bulgaricus*. Выделенный препарат, названный бластолизин, используется в медицине и обладает противоопухолевыми свойствами. В совместном исследовании болгарских и московских ученых при изучении гликопептида бластолизина установлена его структура [4, 5, с.79-86]. Этот гликопептид представляет собой дисахарид пентапептид, в котором пептидная часть состоит из следующей последовательности аминокислот: L-Ala-D-Glu-L-Lys-D-Asp-D-Ala. Начальная часть молекулы гликопептида установленной структуры представляет собой GMDP. Московскими учеными ИБХ им. Шемякина впервые был синтезирован GMDP, изучены его свойства и установлено, что препарат обладает противоопухолевой активностью аналогичной MDP [6].

Дальнейшие исследования: доклинические испытания, лекарственная форма и масштабирование технологии осуществлены в Латвии Институтом органического синтеза (г. Рига) и НПО «Биолар» (г. Олайне) [7, 8].

В мире были получены два фармацевтических препарата : Ромуртид – аналог MDP, производимый в Японии, и Ликопид – аналог GMDP, производимый в России, а также ветеринарный препарат Гликопин (аналог GMDP) - производитель ЗАО “Пептек” (Россия).

Следует отметить, что средняя смертельная доза (LD_{50}), характеризующая токсичность препарата, равна для MDP (Ромуртид) и GMDP (Ликопид и Гликопин) соответственно 25 и 100 мг/кг [9, с.89-90, 10].

По нашему мнению необходимо дальнейшее исследование природных гликопептидов из молочнокислых бактерий, включая их выделение и характеристику свойств. Такие препараты могут быть менее токсичными, более дешевыми и найти широкое применение в качестве добавки для укрепления защитных сил организма, как человека так и животных.

Исследования показали, что применение природных гликопептидов в кормлении мышей и молодняка кроликов, во всех использованных дозах (рекомендуемая, десяти- и стократная) не вызывало гибели подопытных животных. Не наблюдалось так же каких-либо отклонений в их общем состоянии, внешнем виде, поведении и потреблении корма. Основные параметры крови животных контрольной и опытных групп находились в пределах физиологической нормы, лейкоцитарная формула во всех группах соответствовала лейкограмме здоровых животных.

Таблица 1. Определение безвредности гликопептида для лабораторных животных

Вид животных	Путь введения микроорганизмов	Контроль	Испытуемые дозы препарата, мг/гол		
			рекомендуемая доза	десятикратная доза	стократная доза
Определение среднесмертельной дозы					
Мыши	внутрибрюшинно	*10/0**	10/0	10/0	10/0
	с кормом	10/0	10/0	10/0	10/0
Определение токсичности					
Мыши	с кормом	10/0	-	10/0	-
Кролики	с кормом	6/0	6/0	6/0	6/0
Местное токсическое и аллергенное воздействие					
Кролики	в конъюнктивный мешок	6/0	-	6/0	-
	втирание в кожу	6/0	-	6/0	-
	аллергенность	6/0	-	6/0	-

Примечание:

* – число животных в группе,

** – число погибших животных или давших реакцию на введение препарата.

Изучение раздражающего действия на конъюнктиву глаза и оценка аллергенности.

При определении воздействия гликопептида на слизистые оболочки глаз кроликов каких-либо изменений со стороны конъюнктивы, роговицы и зрачка не обнаружено. Не было гиперемии слизистой, отёчности или гнойных истечений из глаза.

Отсутствовало и местное токсическое действие изучаемого препарата при нанесении на кожу кроликам. Не было утолщения кожной складки после втирания культуры; болезненность, припухлость, повышение температуры в месте нанесения отсутствовали.

Как показали дальнейшие исследования препарата, то он не проявлял аллергенных свойств: на месте нанесения препарата в соответствии с существующей методикой аллергической реакции в виде инфильтрации, изъязвления, некрозов ткани не наблюдалось.

Заключение. В настоящей работе была изучена безвредность природных гликопептидов (табл. 1). Исходя из полученных данных, изучаемый нами препарат не оказывает токсичного, токсигенного и аллергенного действия на организм лабораторных животных, не раздражает неповрежденные слизистые оболочки.

Значения средней смертельной дозы (LD_{50}) для исследуемых природных гликопептидов из различных видов лактобактерий (*Lactobacillus bulgaricus*, *L. Acidophilus*, *L. Plantarum*) лежат в пределах 6000 – 7000 мг/кг. Эти значения намного выше, чем LD_{50} для синтетических гликопептидов MDP и GMDP 25 мг/кг и 100 мг/кг соответственно.

По совокупности полученных данных следует, что ни один из природных гликопептидов не токсичен для лабораторных животных и изучаемые препараты может быть отнесен к четвертому классу опасности, т.е. является безопасным для животных и человека.

Список литературы

1. Инструкция о гигиенических требованиях к новым препаратам химического и биологического синтеза, предлагаемым для использования в составе рационов или для консервирования кормов с.-х. животных, продукция от которых идет в пищу населения. // Кн.: Ветеринарные препараты. Справочник. М.: Агропромиздат, 1988. 230-239.
2. Методические указания по определению токсических свойств препаратов, применяемых в ветеринарии и животноводстве. // Кн.: Ветеринарные препараты. Справочник. М.: Агропромиздат, 1988: 239-289.
3. *Ellouz F., Adams A., Ciorbarn R., Lederer F.* Muram peptides and lipopeptides: Studies towards immunostimulants. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1974. 59. 1317-1320.
4. *Безруков М.В.* Структура активного компонента бластолизина. Синтез и свойства родственных соединений. // Автореферат дисс. Москва (Россия), 1987.
5. *Bogdanov L.G., Dalev P.G. and et al.* Antitumor glycopeptides from *Lactobacillus Bulgaricus* cell wall. // *FEBS Letters*, 1975. 57(3). 79-86.
6. *Овчинников Ю.А., Иванов В.Т. и др.* Гликопептиды, обладающие противоопухолевой активностью и способ их получения. // Авторское свидетельство СССР № 727647, 1980.
7. *Ермолаев Е.Д., Земтурис М.М., Софронова О.В. и др.* Способ выделения О-(2-ацетиламино-2-деокси-β-Д- глюкопиранозил) – (1-4) – 2 - ацетиламино – 3 – О - 1 – карбоксиэтил) - 2-деокси- Д-глюкозы из биомассы *Micrococcus lysodeikticus*. // Авторское свидетельство СССР № 1496229, 1985.
8. *Подгорнова Н.Н., Ермолаев Е.Д., Лудрика Р. и др.* Способ получения гликопептидов. // Авторское свидетельство СССР №1705303, 1991.
9. *Lefrancier P., Derren M., Ghoady I.* Apyrogenic, adjuvant active N-acetylmuramyl – dipeptides. // *J. Med. Chem.*, 1982. 25. 87-90.
10. *Подгорнова Н.Н.* Лабораторная методика производства GMDP. // НПО «Биолар». Олайне. Латвия, 1988.