

«БЕЛКОВАЯ ВЕТЕРИНАРИЯ» КАК АЛЬТЕРНАТИВА АНТИБИОТИКАМ. ЛЕЧЕБНО-ПРОФИЛАКТИЧЕСКИЕ ВЕТЕРИНАРНЫЕ ПРЕПАРАТЫ НА ОСНОВЕ РЕКОМБИНАНТНЫХ БЕЛКОВ

М. И. ПОТАПОВИЧ¹⁾, В. А. ПРОКУЛЕВИЧ¹⁾

¹⁾Белорусский государственный университет, пр. Независимости, 4, 220030, г. Минск, Республика Беларусь

Показана важность проблемы бесконтрольного использования антибиотиков и сопутствующего этому распространения антибиотикоустойчивых микроорганизмов. Представлены данные по влиянию на организм животных разработанных ветеринарных препаратов на основе рекомбинантных видоспецифичных цитокинов. На кафедре микробиологии биологического факультета созданы и зарегистрированы видоспецифичные лечебно-профилактические препараты на основе рекомбинантных цитокинов для мелких домашних животных (собаки, кошки), крупного рогатого скота, лошадей, свиней. Ведутся разработки препаратов для овец и коз, кур и других животных. В ходе исследований эффективности антибиотиков на животных изучено влияние препаратов на основные иммунологические показатели организма и показано их мощное иммуностимулирующее действие. В частности, после введения животным рекомбинантных видоспецифичных интерферонов происходило увеличение бактерицидной и лизоцимной активности сыворотки крови, фагоцитарной активности нейтрофилов, содержания Т- и В-лимфоцитов, сегментоядерных нейтрофилов, иммуноглобулина G и компонента C3.

Ключевые слова: инфекционные заболевания; антибиотикорезистентность; цитокин; интерферон; иммунная система; видоспецифичность; ветеринарный препарат.

«PROTEIN VETERINARY» AS ALTERNATIVE TO ANTIBIOTICS. TREATMENT-AND-PROPHYLACTIC VETERINARY PREPARATIONS BASED ON RECOMBINANT PROTEINS

M. I. PATAPOVICH^a, U. A. PRAKULEVICH^a

^aBelarusian State University, Nezavisimosti avenue, 4, 220030, Minsk, Republic of Belarus

The purpose of the article – to show the importance of the problem of the uncontrolled use of antibiotics and the concomitant spread of antibiotic-resistant microorganisms, as well as to provide data on the effect of developed species-specific recombinant cytokine-based veterinary preparations on the animal's organism. At the Department of Microbiology of the Belarusian State University species-specific cytokine-based therapeutic and preventive preparations for small animals (dogs, cats), cattle, horses and pigs are developed. During experiment these preparations showed potent antiviral and immunostimulatory effects in animals. In particular, after administration of species-specific recombinant interferons an increase in lysozyme and bactericidal activity of blood serum, neutrophils phagocytic activity, the content of T and B-lymphocytes, segmented neutrophils, immunoglobulin G and complement C3 was observed.

Key words: infectious diseases; antibiotic resistance; cytokine; interferon; immune system; species-specificity; veterinary preparation.

Образец цитирования:

Потапович М. И., Прокулевич В. А. «Белковая ветеринария» как альтернатива антибиотикам. Лечебно-профилактические ветеринарные препараты на основе рекомбинантных белков // Вестн. БГУ. Сер. 2, Химия. Биология. География. 2016. № 2. С. 3–

For citation:

Patapovich M. I., Prakulevich U. A. «Protein veterinary» as alternative to antibiotics. Treatment-and-prophylactic veterinary preparations based on recombinant proteins. *Vestnik BGU. Ser. 2, Khimiya. Biol. Geogr.* 2016. No. 3. P. 3– (in Russ.).

Авторы:

Максим Иосифович Потапович – заведующий научно-исследовательской лабораторией биотехнологии кафедры микробиологии биологического факультета.

Владимир Антонович Прокулевич – доктор биологических наук, профессор; заведующий кафедрой микробиологии биологического факультета.

Authors:

Maksim Patapovich, head of the laboratory of biotechnology, department of microbiology, faculty of biology.

mipatapovich@gmail.com

Uladzimir Prakulevich, doctor of science (biology), full professor; head of the department of microbiology, faculty of biology.

prokulevich@mail.ru

Инфекционные заболевания в настоящее время представляют одну из самых актуальных проблем, стоящих перед человечеством. Успешная борьба с ними является залогом как здоровья и благополучия самого человека, так и продовольственной безопасности, поскольку инфекционные болезни животных наносят колоссальный экономический ущерб в животноводстве и напрямую влияют на обеспеченность населения продуктами питания. 61 % болезней животных – это зоонозы, т. е. потенциально такие заболевания могут вызывать пандемии у человека [1, с. 5].

По оценкам Всемирной организации здоровья животных, потери в продуктивности животных из-за болезней составляют 20 %.

В 2016 г. в ЕС выделено почти 161 млн евро на мероприятия по борьбе с болезнями животных.

Наибольшую угрозу среди заболеваний животных представляют вирусные, а также смешанные (бактериально-вирусные) инфекции, при которых попавший и размножившийся в организме вирус «открывает ворота» для проникновения и развития бактериальных патогенов, причем в данном случае очень часто угрозой становятся даже микроорганизмы, не вызывающие в норме развития инфекционного процесса. В условиях современного промышленного животноводства в хозяйствах, как правило, циркулирует определенный спектр патогенов, включающих бактерии, вирусы, грибы и др., которые при малейшем ухудшении состояния здоровья животных и ослаблении иммунитета приводят к развитию заболеваний [2, с. 469; 3, с. 189–190; 4, с. 10].

На протяжении длительного времени проблему инфекционных заболеваний в животноводстве решают с помощью антибиотиков, действие которых направлено на борьбу с бактериальной составляющей инфекционного процесса (например, при смешанных инфекциях), при этом вирусный компонент остается неуязвимым. В случае же возникновения очагов высококонтагиозных инфекционных заболеваний, и в первую очередь к ним относятся вирусные, принимаются радикальные меры в виде истребления поголовья и введения жестких карантинных мер. Ни о какой профилактике здоровых животных, которые могут подвергнуться риску заражения, речи не идет. Успех таких экстренных мероприятий зависит от числа случаев передачи заболевания до момента появления клинических симптомов. В экспериментальном исследовании по распространению ящура у коров было показано, что эта величина как минимум в 2 раза меньше ожидаемого значения. Инфицированные ящуром коровы значительно реже становились источником инфекции до того, как проявлялись клинические симптомы, что говорит о переоценке необходимости прежде всего превентивной выбраковки. Результаты исследования указывают, что профилактика контактировавших животных антивирусными препаратами может быть более оправданной в предотвращении распространения болезни [5, с. 726].

Многочисленные антибиотики (АБ) в животноводстве используются зачастую бесконтрольно и без четко определенных причин. Кроме того, антибиотики широко применялись (и во многих странах применяются) для ускорения роста животных.

Устойчивость микроорганизмов к антибиотикам уже много лет признается глобальной угрозой для здоровья человека. В настоящее время этот вопрос признан Всемирной организацией здравоохранения (ВОЗ) одной из главных проблем XXI в.

Среди разных схем использования антибиотиков длительное применение малых доз у продуктивных животных создает идеальное селективное давление для развития и селекции резистентных штаммов. Распространение устойчивости может происходить как при непосредственном контакте, так и непрямым путем – через воду, корм и отходы животноводства, которые вносятся на поля. Данный эффект также может усиливаться из-за горизонтального переноса генетических элементов (плазмид) в ходе конъюгации у бактерий.

Доказанной считается передача резистентных к антимикробным препаратам бактерий от животных к человеку в хозяйствах, использующих антибиотики для лечения и/или нетерапевтического использования [6, с. 1130–1131; 7, с. 280; 8, с. 718–719].

Сочетание повышенного селекционного давления от использования антимикробных препаратов, ускорения передачи заболеваний и спада в разработке новых антибиотиков привело к расширению спектра заболеваний, которые ранее были излечимыми, а превратились в неизлечимые [9, с. 762].

Сообщается, что зачастую до 80 % антибиотиков (а в некоторых случаях до – 95 %), которые животные получают перорально, проходят через их организм в неизменном виде и попадают с отходами в богатые микроорганизмами отстойники, после чего используются в качестве удобрений для полей. Эти остаточные количества АБ, антибиотикорезистентные бактерии и R-плазмиды далее легко мигрируют в поверхностные и грунтовые воды [10, с. 727].

Проведены исследования, направленные на определение того, способны ли растения, выращенные на удобренной навозом почве, абсорбировать АБ, присутствующие в навозе. Показано, что абсорбция АБ увеличивается с увеличением их концентрации. Данное исследование указывает на существующий риск для здоровья человека при употреблении в пищу свежих овощей, выращенных на полях, удобренных навозом [11, с. 2082].

Дети, в особенности маленькие, входят в группу высокого риска возникновения инфекций, вызываемых антибиотикоустойчивыми микроорганизмами, появление которых напрямую связано с использованием АБ в животноводстве. Кроме того, у детей высок риск развития постинфекционных осложнений [12, с. 253].

В Европе около 25 тыс. человек умирают ежегодно от заболеваний, вызываемых антибиотикорезистентными бактериями [13, с. 4]. В США метициллин-резистентный *Staphylococcus aureus* вызывает 90 тыс. случаев заболеваний, при этом около 19 тыс. человек умирают ежегодно [14, с. 1].

Ограничения использования АБ в ЕС начались в 1997 г., когда было запрещено использование авопарцина для стимуляции роста животных. В 1999 г. также было запрещено применение тилозина, спирамицина, бацитрацина, виргиниамицина, карбадокса и олаквиндокса для ускорения роста животных. Остальные стимуляторы были запрещены в 2006 г. Хотя в ЕС и требуется ветеринарный рецепт на использование АБ для продуктивных животных, однако в некоторых случаях отдельные страны-члены могут получать разрешение на их применение [15, с. 4].

Защита организма как животных, так и человека от инфекционных агентов напрямую зависит от полноценного функционирования иммунной системы. При нарушениях в ее работе, угнетении и прочих сбоях резко повышается риск заражения как вирусными, так и бактериальными патогенами. Если говорить обобщенно, то все инфекционные заболевания животных есть результат расстройства иммунной системы. При этом чем более продуктивным является животное, тем слабее у него иммунная система и тем больше оно подвержено заражению.

Однако, несмотря на сложность ситуации, иммунную систему можно корректировать и восстанавливать ее функционирование. При этом в организме есть класс белковых молекул (цитокины), которые по своей природе как раз и являются теми самыми эффективными иммуномодуляторами. К данному классу молекул, в частности, относятся интерфероны (ИФН), уровень значимости которых в функционировании иммунной системы сложно переоценить.

В настоящее время выделяют 3 типа ИФН. Наиболее крупным по количеству представителей является I тип, к которому относят порядка 20 различных белков. II тип составляет гамма-ИФН, а III тип – лямбда-ИФН. Среди представителей I типа ИФН отдельно можно выделить семейство альфа-ИФН, которое у животных представлено различным числом молекул (как правило, более 10). Основной (но далеко не единственной) функцией альфа-ИФН в организме является антивирусная, которая заключается в индукции состояния неспецифической защиты от любых ДНК- или РНК-содержащих вирусов. В свою очередь, гамма-ИФН, относящийся ко II типу, помимо антивирусного действия, которое для него не является основным, обладает спектром активностей, в конечном итоге направленных на модулирование иммунной реакции и в первую очередь ее клеточных компонентов. Благодаря его действию резко активизируются все иммунные процессы, обуславливающие в том числе и элиминирование патогенов. Аналогов этому эффективному, эволюционно сложившемуся у человека и животных защитному механизму не существует [16, с. 3–4]. Интерфероны крайне важны в антивирусной терапии, поскольку образуются на ранней стадии инфекционного процесса и играют основную роль в выздоровлении.

Вскоре после открытия ИФН и их действия был налажен выпуск различных ИФН (прежде всего – человеческого) из крови (так называемые лейкоцитарные ИФН). Данный процесс был очень трудоемким и затратным, отличался дефицитом сырья и риском заражения рядом высокоопасных заболеваний, передающихся через кровь. Несмотря на это, широко известны примеры использования лейкоцитарных ИФН для лечения болезней не только человека, но и животных.

С развитием технологий рекомбинантных ДНК появилась возможность получать ИФН в больших количествах и относительно недорогим способом. В настоящее время получение рекомбинантных белков с использованием про- или эукариотических продуцентов практически полностью вытеснило другие способы. Производство рекомбинантных белков с применением бактериальных штаммов-продуцентов является наиболее экономически выгодным по сравнению с другими подходами.

Молекулы ИФН характеризуются чрезвычайно высокой активностью (108 МЕ/мг и более), что позволяет использовать относительно невысокие дозировки в конечных формах препаратов. Показано, что ИФН в высокой концентрации обладают ярко выраженным антипролиферативным действием (одним из векторов их использования как раз и является борьба со злокачественными новообразованиями) и, кроме того, введение экзогенного ИФН в высокой концентрации ингибирует выработку в организме собственного ИФН; при введении же более низких терапевтических концентраций ИФН действует как аутоиндуктор, стимулируя выработку организмом собственных защитных белков [17, с. 621].

Существует практика использования рекомбинантных ИФН, в частности человеческого интерферона для лечения заболеваний животных. Однако в целом лечение животных с использованием экзогенных интерферонов не практикуется широко из-за отсутствия на рынке видоспецифичных ИФН.

Следует обратить внимание, что действие ИФН является видоспецифичным, т. е. ИФН человека в меньшей мере действует (или не действует вовсе) на животных, чем на самого человека. Причина кроется в том, что эволюционно сложившиеся паттерны взаимодействия между белком и рецептором являются настолько четко отлаженной системой, что даже незначительные различия в аффинности связывания лиганда с рецептором приводят к развитию кардинально разных сигнальных каскадов и, соответственно, эффектов [17, с. 630]. Кроме этого, при неоднократном введении в организм чужеродного белка встает вопрос о возможных аллергических и других негативных реакциях, что сводит на нет все положительные аспекты такого лечения.

На кафедре микробиологии биологического факультета БГУ ведутся разработки новых видоспецифичных ветеринарных препаратов для животноводства на основе рекомбинантных белков животных (интерфероны, колониестимулирующие факторы, антибактериальные белки и пептиды, вакцинные антигены и др.). Создан полный биотехнологический процесс – от конструирования высокоэффективных штаммов-продуцентов до получения готовых лекарственных форм.

В настоящее время разработаны и зарегистрированы видоспецифичные лечебно-профилактические препараты для мелких домашних животных (собаки, кошки), крупного рогатого скота, лошадей, свиней. Ведутся разработки препаратов для овец и коз, кур и других животных.

В ходе исследований эффективности действия препаратов на животных было изучено влияние лекарств на основные иммунологические показатели организма. В частности, показано, что после введения телятам бычьего рекомбинантного альфа-интерферона в дозе 1 мл/10 кг массы тела (содержание ИФН составляло $3 \cdot 10^4$ МЕ/мл) происходило увеличение следующих иммунологических показателей: бактерицидной активности сыворотки крови через 24 ч – на 53 %, через 48 ч – на 38 %; лизоцимной активности сыворотки крови – на 45 и 41,8 %; Т-лимфоцитов – на 32 и 41,4 %; В-лимфоцитов – на 33,8 и 56,8 %; фагоцитарной активности нейтрофилов – на 13,4 и 11,5 % соответственно.

Кроме того, в лейкограмме крови увеличилось содержание сегментоядерных нейтрофилов через 24 ч на 46,5 %, через 48 ч – на 36,2 %, а из специфических белков возросло содержание комплемента С3 на 67 % через 24 ч и на 38,5 % через 48 ч.

При проведении испытаний лошадиного рекомбинантного альфа-ИФН на лошадях животным вводили $1 \cdot 10^6$ МЕ препарата на голову. В результате отмечено достоверное повышение содержания лимфоцитов на 195 и гемоглобина на 5,2 %, что свидетельствует о стимуляции клеточного иммунитета и росте защитных сил организма. Отмечено также увеличение иммуноглобулина G на 49 %, способствующее усилению сопротивляемости организма инфекционным агентам. При применении лошадиного рекомбинантного альфа-ИФН наблюдалось достоверное увеличение бактерицидной активности сыворотки крови на 57,4 %, что свидетельствует об усилении гуморальной защиты организма лошадей. Произойдет достоверное увеличение содержания Т-лимфоцитов на 79,4 % и В-лимфоцитов на 27 %, а также рост фагоцитарного числа на 46,7 % и фагоцитарного индекса на 48,2 %, а это говорит об активизации клеточного иммунитета.

После введения поросятам свиного рекомбинантного альфа-интерферона в дозе 1 мл/10 кг массы тела (содержание ИФН составляло $2 \cdot 10^4$ МЕ/мл) происходило увеличение бактерицидной активности сыворотки крови через 24 ч на 56 %, через 48 ч – на 27 %; лизоцимной активности сыворотки крови – на 15,9 и 30,0 %; фагоцитарной активности нейтрофилов – на 5 и 10 %; Т-лимфоцитов – на 8,1 и 9,0 %; В-лимфоцитов – на 56,7 и 65,8 % соответственно.

Кроме того, в лейкограмме крови повысилось содержание сегментоядерных нейтрофилов через 24 ч на 24,1 %, а из специфических белков возросло содержание комплемента С3 на 30,9 % через 48 ч.

На основании представленных результатов можно сделать вывод о том, что разработка видоспецифических ветеринарных препаратов на основе рекомбинантных ИФН и создание системы мероприятий по профилактике и оздоровлению поголовья путем мобилизации защитных регуляторных механизмов организма животных позволяют эффективно бороться со многими инфекционными заболеваниями, а также они способны стать альтернативой применению антибиотиков в животноводстве.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК (REFERENCES)

1. IFAH. The costs of animal disease. Oxford Analytica // Report International Federation for Animal Health. London, 2012.
2. Mills E. Viral infections predisposing to bacterial infections // *Annu. Rev. Med.* 1984. № 35. P. 469–479 [Mills E. Viral infections predisposing to bacterial infections. *Annu. Rev. Med.* 1984. No. 35. P. 469–479 (in Engl.)].
3. Hament J. M., Kimpfen J., Fleer A., Wolfs T. Respiratory viral infection predisposing for bacterial disease: a concise review // *FEMS Immun. Medl Microbiol.* 1999. Vol. 26, № 3/4. P. 189–195 [Hament J. M., Kimpfen J., Fleer A., Wolfs T. Respiratory viral infection predisposing for bacterial disease: a concise review. *FEMS Immun. Medl Microbiol.* 1999. Vol. 26, No. 3/4. P. 189–195 (in Engl.)].
4. Brogden K., Guthmiller J. Polymicrobial diseases. Washington, 2002.
5. Charleston B., Bankowski B., Gubbins S., Chase-Topping M., Schley D., Howey R., Barnett P., Gibson D., Juleff N., Woolhouse M. Relationship between clinical signs and transmission of an infectious disease and the implications for control // *Science.* 2011. Vol. 332,

№ 6030. P. 726–729 [Charleston B., Bankowski B., Gubbins S., Chase-Topping M., Schley D., Howey R., Barnett P., Gibson D., Juleff N., Woolhouse M. Relationship between clinical signs and transmission of an infectious disease and the implications for control. *Science*. 2011. Vol. 332, No. 6030. P. 726–729 (in Engl.)].

6. *Khachatourians G.* Agricultural use of antibiotics and the evolution and transfer of antibiotic-resistant bacteria // *CMAJ*. 1998. Vol. 159, № 9. P. 1129–1136 [Khachatourians G. Agricultural use of antibiotics and the evolution and transfer of antibiotic-resistant bacteria. *CMAJ*. 1998. Vol. 159, No. 9. P. 1129–1136 (in Engl.)].

7. *Barton M.* Antibiotic use in animal feed and its impact on human health // *Nutr. Res. Rev.* 2000. Vol. 13, № 2. P. 279–299 [Barton M. Antibiotic use in animal feed and its impact on human health. *Nutr. Res. Rev.* 2000. Vol. 13, No. 2. P. 279–299 (in Engl.)].

8. *Marshall B., Levy S.* Food animals and antimicrobials: impacts on human health // *Clin. Microbiol. Rev.* 2011. Vol. 24, № 4. P. 718–733 [Marshall B., Levy S. Food animals and antimicrobials: impacts on human health. *Clin. Microbiol. Rev.* 2011. Vol. 24, No. 4. P. 718–733 (in Engl.)].

9. *Cohen M.* Changing patterns of infectious disease // *Nature*. 2000. Vol. 406, № 6797. P. 762–767 [Cohen M. Changing patterns of infectious disease. *Nature*. 2000. Vol. 406, No. 6797. P. 762–767 (in Engl.)].

10. *Sarmah A., Meyer M., Boxall A.* A global perspective on the use, sales, exposure pathways, occurrence, fate and effects of veterinary antibiotics (VAs) in the environment // *Chemosphere*. 2006. Vol. 65, № 5. P. 725–759 [Sarmah A., Meyer M., Boxall A. A global perspective on the use, sales, exposure pathways, occurrence, fate and effects of veterinary antibiotics (VAs) in the environment. *Chemosphere*. 2006. Vol. 65, No. 5. P. 725–759 (in Engl.)].

11. *Kumar K., Gupta S., Baidoo S., Chander Y., Rosen C.* Antibiotic uptake by plants from soil fertilized with animal manure // *J. Environ. Qual.* 2005. Vol. 34, № 6. P. 2082–2085 [Kumar K., Gupta S., Baidoo S., Chander Y., Rosen C. Antibiotic uptake by plants from soil fertilized with animal manure. *J. Environ. Qual.* 2005. Vol. 34, No. 6. P. 2082–2085 (in Engl.)].

12. *Shea K.* Antibiotic resistance: what is the impact of agricultural uses of antibiotics on children's health? // *Pediatrics*. 2003. Vol. 112, № 1. P. 253–258 [Shea K. Antibiotic resistance: what is the impact of agricultural uses of antibiotics on children's health? *Pediatrics*. 2003. Vol. 112, No. 1. P. 253–258 (in Engl.)].

13. ECDC/EMEA Joint Working Group. ECDC/EMEA Joint Technical Report: The bacterial challenge: time to react. Stockholm: European Centre for Disease Prevention and Control. 2009. URL: http://www.ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/Forms/ECDC_DispForm.aspx?ID=444 (date of access: 15.03.2016).

14. Alliance for the prudent use of antibiotics: the cost of antibiotic resistance to US families and the health care system. 2010. URL: http://www.tufts.edu/med/apua/consumers/personal_home_5_1451036133.pdf (date of access: 10.02.2016).

15. *Maron D., Smith T., Nachman K.* Restrictions on antimicrobial use in food animal production: an international regulatory and economic survey // *Global. Health*. 2013. Vol. 9, № 48. P. 1–11 [Maron D., Smith T., Nachman K. Restrictions on antimicrobial use in food animal production: an international regulatory and economic survey. *Global. Health*. 2013. Vol. 9, No. 48. P. 1–11 (in Engl.)].

16. *The Interferons: Characterization and Application* / ed. by A. Meager. Weinheim, 2006.

17. *Thomas C., Moraga I., Levin D., Krutzik P. O., Podoplelova Y., Trejo A., Lee C., Yarden G., Vleck S. E., Glenn J. S., Nolan G. P., Piehler J., Schreiber G., Garcia K. C.* Structural linkage between ligand discrimination and receptor activation by type I interferons // *Cell*. 2011. Vol. 146, № 4. P. 621–632 [Thomas C., Moraga I., Levin D., Krutzik P. O., Podoplelova Y., Trejo A., Lee C., Yarden G., Vleck S. E., Glenn J. S., Nolan G. P., Piehler J., Schreiber G., Garcia K. C. Structural linkage between ligand discrimination and receptor activation by type I interferons. *Cell*. 2011. Vol. 146, No. 4. P. 621–632 (in Engl.)].

Статья поступила в редколлегию 22.06.2016.
Received by editorial board 22.06.2016.