

27–30 grams for the experiment. The animals of research groups were injected intraperitoneally with suspension culture of the pathogen in the same dose of 0.5 ml and different concentrations named above for each group. Animals of the control group were injected with physiological solution.

After 7, 14 and 21 days three mice from each group were euthanized for research on tuberculosis. During anatomicopathological autopsy liver and spleen were picked out for bacterioscopic, cultural and biological studies. Before cultural research inner organs were processed by Alikayevoya A.P. method and after that received on physiological saline suspension was used to infect guinea pigs weighing 300–350 grams, from which formed three researched groups and 1 controlled group of 9 heads. Research and control guinea pigs at 7, 14, 21, 30 and 60 days after infection were examined by allergic method on tuberculosis using tuberculin (PPD) for mammals at a dose of 0.1 ml. Animals that died during the experiment and after its ending, studied by anatomicopathological method on tuberculosis.

Results of the study testified to the culture of *Mycobacterium tuberculosis* of bovine species (st. *Vallae*) after passage on outbred white mice with the next injection to guinea pigs, predetermined in the latest progressive tuberculous process of different intensity (depending on dose) to the stage of generalized tuberculosis with mortality cases of animals on 15 day earlier compared with the control group.

About raising the level of immune responsiveness in guinea pigs of research groups showed the results of endermic tuberculin tests: swelling (intumescence) at the spot (site) of allergen appeared week earlier compared with the animals of control group.

Keywords: tuberculosis, allergic diagnosis, tuberculin, white mice, guinea pigs.

УДК 578.825.1:615.849.19:619:636.22/28

РЕЗУЛЬТАТЫ ИЗУЧЕНИЯ АНТИВИРУСНОГО ДЕЙСТВИЯ ЛАЗЕРНОГО ИЗЛУЧЕНИЯ

Красочко П.А., Борисовец Д.С., Чайковский П.С.

Республиканское унитарное предприятие «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н.Вышелесского», г. Минск, Республика Беларусь, e-mail: krasochko@mail.ru

Плавский В.Ю.

Государственное научное учреждение «Институт физики НАН Беларуси», г. Минск, Республика Беларусь

Красочко П.П.

Учреждение образования «Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины», г. Витебск, Республика Беларусь

Целью настоящего исследования явилось изучение репродукции вируса инфекционного ринотрахеита крупного рогатого скота на фоне воздействия низкоинтенсивного лазерного излучения (НИЛИ). Научная значимость статьи состоит в том, что в материале впервые приведены результаты угнетающего действия низкоинтенсивного лазерного излучения на репродукцию вируса инфекционного ринотрахеита крупного скота на перевиваемой культуре клеток МДБК. Для оценки степени репродукции вируса использована полимеразная цепная реакция в режиме реального времени. Полученные результаты свидетельствуют, что облучение монослоя культуры клеток низкоинтенсивным лазерным излучением приводит к угнетению репродукции вируса инфекционного ринотрахеита. Характерно, что предварительное облучение угнетает репродукцию количество вируса, т.е. увеличение экспозиции до заражения снижает противовирусный эффект со 220 до 122 %, тогда как увеличение экспозиции облучения после заражения более существенно угнетает репродукцию вируса со 139 до 826 %. Это свидетельствует, что низкоинтенсивное лазерное излучения активизирует метаболизм клеток, препятствует проникновению вируса в клетку и тем самым происходит угнетение его репродукции.

Ключевые слова: низкоинтенсивное лазерное излучение, вирус инфекционного ринотрахеита крупного рогатого скота, культура клеток, полимеразная цепная реакция.

В настоящее время вопрос о молекулярном механизме биологической активности поляризованного света остается открытым.

Как известно, в большинстве случаев в основе патологий у животных и человека лежит нарушение функциональной активности различных типов клеток, образующих ткани их тела. Химические и физические факторы, оказывающие регуляторное действие на функциональную активность клеток животных и человека потенциально могут использоваться в качестве лечебных факторов.

Эффективное регуляторное действие на функциональную активность указанных клеток поляризованного НИЛИ ближнего ультрафиолетового, видимого и ближнего инфракрасного спектральных диапазонов определяет широкий круг его терапевтических эффектов. Считается, что регуляторное действие поляризованного светового излучения на функциональную активность клеток млекопитающих обусловлено его обратимым модифицирующим действием на пространственное строение их мембран и молекул белков-ферментов (молекулярных систем, управляющих метаболизмом клеток) и зависимость от пространственного строения управляющую активность этих молекулярных структур. На основе экспериментальных данных сделан вывод, что обратимые изменения пространственного строения молекул белков-ферментов и мембран клеток инициируются ориентационной энергией взаимодействия электрического поля излучения с индуцируемым этим полем интегральными диполями доменов указанных молекулярных систем. Результаты экспериментальных исследований показали, что регуляторное действие на функциональную активность клеток млекопитающих оказывает только поляризованное излучение лазеров и поляризованное некогерентное излучение светодиодов, эффект действия зависит от его плотности мощности в зоне действия [3, 4].

Установлено, что приоритетное значение в реализации биологического действия оптического излучения отводится его поляризации. При этом наиболее убедительные подтверждения зависимости биологической активности оптического излучения от поляризации получены в условиях *in vitro* с клетками крови ($\lambda = 400\text{--}800$ нм, $P = 40$ мВт/см²) и культивируемыми клетками ($\lambda = 632.8$ нм, $P = 3$ мВт/см²). При этом регуляторным действием обладает лишь линейно поляризованное излучение; неполяризованное излучение в том же дозовом интервале не влияет на структурно-функциональные характеристики клеточных мембран и скорость клеточной пролиферации. При этом величины стимулирующего действия, индуцируемого линейно поляризованным излучением лазера ($\lambda = 632.8$ нм) и квазимонохроматического светодиодного источника ($\lambda = 630$ нм, $\Delta\lambda = 15$ нм), практически не отличаются. Отмечено, что излучение лазера ($\lambda = 632.8$ нм) вызывает синхронную перестройку всех исследованных метаболических процессов в ткани, тогда как тепловой источник ($\lambda = 630$ нм, $\Delta\lambda = 150$ нм) индуцирует разнонаправленную динамику этих показателей. При определенных условиях биологическая активность и терапевтическое действие оптического излучения низкой интенсивности видимой и ИК областей спектра могут зависеть как от степени когерентности излучения, так и от его поляризации [1, 4].

Хорошо известно, что при прохождении излучения через биологическую ткань наблюдается его быстрая деполяризация. В литературе широко распространено мнение, что ни когерентность, ни поляризация низкоинтенсивного излучения не могут сказываться на его биологической активности, поскольку для этого отсутствуют какие-либо фотофизические предпосылки. Для анализа возможных причин зависимости фотобиологических эффектов от параметров воздействующего излучения рассмотрим существующие точки зрения на механизмы биологической активности света. Совокупность имеющихся гипотез можно разделить на две группы: фотохимическую и нефотохимическую (нерезонансную).

В настоящее время широко используется фототерапия с использованием лазеров (низкоинтенсивное лазерное излучение). Однако, несмотря на бесспорную эффективность, использование различных видов лазеров сопряжено с рядом трудностей и противопоказаний, как-то: воздействие лазерного излучения должно проводиться в специальных условиях, при которых необходимо исключить воздействие излучения на пациента и персонал за счет зеркального и диффузного отражения. Также, вследствие высокой интенсивности (минимум 100–200 мВт/см) и теплового эффекта, лазерное излучение имеет большое количество противопоказаний [2].

При использовании лазерного излучения при вирусных инфекциях отмечается положительный клинический эффект. Учитывая тот факт, что вирусы – абсолютные паразиты и для их репродукции необходима живая клетка, нами было сделано предположение, что при непосредственном воздействии на клетки может отмечаться угнетение репродукции вирусов при их заражении.

Целью настоящего исследования явилось изучение репродукции вируса инфекционного ринотрахеита крупного рогатого скота под воздействием низкоинтенсивного лазерного излучения.

Материалы и методы. Исследования проводили в условия отдела вирусных инфекций РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского», научно-исследовательского института УО «Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины».

Объектом исследований служили перевиваемая культура клеток почки телят МДБК, вирус инфекционного ринотрахеита (КМИЭВ-6).

В работе использован сформированный монослой перевиваемой культуры клеток МДБК на матрасе объемом 0,5 л, выращенный с использованием среды Игла (ДМЭМ, производства ФГБУ «Институт полиомиелита и вирусных энцефалитов РАМН имени М. П. Чумакова) с 10 % нормальной сывороткой крови.

Изучение влияния на репродукцию вируса инфекционного ринотрахеита низкоинтенсивного лазерного излучения проводили в 2 этапа. В первой серии опытов монослой облучали низкоинтенсивным лазерным излучением по 1,0; 1,5 и 2,0 минуты при интенсивности излучения 1 Вт/см², после чего производили заражение клеток. Во второй серии опытов облучение монослоя культуры клеток проводили низкоинтенсивным лазерным излучением по 1,0; 1,5 и 2,0 минуты при интенсивности излучения 1 Вт/см². Контроль – зараженный монослой клеток вирусом без облучения.

Через 48 часов после заражения во всех матрасах отмечено характерное для вируса ИРТ ЦПД. После замораживания клеток, в каждом образце провели обнаружение вируса с использованием количественной полимеразной цепной реакции в режиме реального времени.

Для выявления комплементарных участков ДНК вируса инфекционного ринотрахеита в исследуемом материале использовали праймер, гомологичный консервативным участкам гена гликопротеина В.

Подбор праймеров и зонда осуществлялся с помощью программы «AlleleID» v6.0 на основе полных и частичных нуклеотидных последовательностей различных штаммов и изолятов вируса ИРТ из международного банка нуклеотидных

последовательностей (GenBank). Синтез праймеров проводили фосфорамидитным методом на автоматическом синтезаторе олигонуклеотидов «BIOSET ASM 800» (Био-Рад).

Выделение ДНК осуществляли с помощью набора DNeasy Blood & Tissue Kit, QIAGEN, а также набора реагентов для выделения ДНК «Нуклеосорб. Комплектация С» (Праймтех, РБ).

Постановку ПЦР проводили в real-time амплификаторе «RotorGene3000» и термоциклере CG1-96 производства «Corbett Reserch», Австралия) по двум методикам: с использованием зонда Taqman для гликопротеина В.

ПЦР ставили в соответствии с температурно-временными циклами, представленными в таблице 1.

Таблица 1 – Температурно-временные циклы при постановке ПЦР

Стадии амплификации	ПЦР для выявления гликопротеина В	ПЦР для выявления гликопротеина D
Первоначальное прогревание	95 °С – 3 мин.	95 °С – 10 мин.
Денатурация	95 °С – 15 сек.	94 °С – 45 сек.
Отжиг	60 °С – 45 сек.	60 °С – 30 сек.
Элонгация		72 °С – 1 мин
Количество циклов*	45	35

Реакционная смесь для ПЦР в реальном времени состояла из: зонд Taqman (3 пмоль/мкл) 1 мкл, праймеры gBR и gBF (4,5 пмоль/мкл) по 1 мкл, смесь дезоксирибонуклеозидтрифосфатов (3 мМ) 2,5 мкл, раствор MgCl₂ (50 мМ) 2 мкл, аммонийный буфер для Taq-полимеразы (10X) 2,5 мкл, стерильная деионизированная вода 9,8 мкл, PrimeTaq-полимераза (5 ед/мкл) 0,2 мкл, раствор выделенной ДНК 5 мкл. Все используемые реагенты производства Праймтех, РБ.

ПЦР осуществляли с парой праймеров GDF: 5'-ATATAAGCTTATGCAAGGGCCGACATTGGC-3' и IrR1: 5'-CGCGGAATTCGTACCCAAAGTGCTTCC-3' комплементарными фрагменту ДНК (1254 п.о.), кодирующему гликопротеин D. Состав реакционной смеси на 1 реакцию включал по 50 pmol каждого праймера, 1 µl смеси dNTP (10 мМ), 4 µl MgCl₂ (25 мМ), 5 µl, 10X TrueStart™ Taq Buffer (Thermo Scientific), 1 µl (5 U) TrueStart™ Taq DNA Polymerase, воду деионизированную до конечного объема 40 µl. В полученную смесь вносили 10 µl выделенной ДНК.

Реакцию проводили в 25 мкл реакционной смеси, состав и температурный цикл которой был различный в зависимости от этапа проводимого исследования.

Положительный контроль для калибровочной кривой получали путем клонирования ампликона, полученного с помощью праймеров BF1 и BR1 с использованием в качестве матрицы ДНК штамм вируса КМИЭВ-6, в плазмиду рХСМ1 (The cloning vector collection, Япония). Полученную плазмиду нарабатывали стандартными молекулярно-биологическими методами, определяли ее концентрацию спектрофотометрически и делали серию разведений 10²–10⁵.

Температурные профили денатурации получали подвергая растворы зонда (0,3 µМ) и зонда с положительным контролем (0,3 µМ и 0,9 µМ соответственно) постепенному снижению температуры с 94 °С до 30 °С и снятием показаний уровня флуоресценции с шагом 1 °С продолжительностью 1 мин и предварительным прогреванием при 94 °С в течение 5 мин в приборе «Bio-Rad IQ5».

Статистическая обработка экспериментальных данных проводилась с использованием компьютерной программы Microsoft Office Excel 2010 и программы Statistica 6.0.

Результаты исследований. При воздействии на монослой культуры клеток МДБК низкоинтенсивного лазерного излучения видимых изменений морфологии клеток не было установлено.

Через 48 часов после заражения во всех матрасах отмечено характерное для вируса ИРТ ЦПД. После замораживания клеток, в каждом образце провели обнаружение вируса с использованием количественной полимеразной цепной реакции в режиме реального времени, чувствительность которой составляет 10 копий/мкл.

Степень угнетения (γ) репродукции вируса ИРТ в культуре клеток МДБК определяли по формуле: $\gamma = 100 - (n_0/n_k) \times 100$ где γ – степень угнетения репродукции вируса; n₀ – количество копий ДНК вируса ИРТ, облученного поляризованным полихроматическим светом; n_к – количество копий ДНК необлученного вируса ИРТ (в контрольной группе).

В таблице 2 и на рисунках 1–2 приведены результаты выявления наличия ДНК вируса ИРТ в культуре клеток МДБК после культивирования с различными сроками облучения монослоя низкоинтенсивным лазерным излучением.

Таблица 2 – Влияние облучения монослоя клеток МДБК низкоинтенсивным лазерным излучением

Режим облучения	Время облучения, мин	Количество копий ДНК	Степень угнетения репродукции вируса ИРТ (γ) %
До заражения	1,0	5188,00+1959,71*	220
До заражения	1,5	7913,67+1350,74	144
До заражения	2,0	7662,50+107,37	112
После заражения	1,0	8182,00+3228,43	139

Розділ 3. Ветеринарна вірусологія та мікробіологія

После заражения	1,5	2758,00+1104*	413
После заражения	2,0	1379,50+228,5*	826
Контроль		11392,00+1938,12	-

Примечание: достоверность * – $P < 0,05$

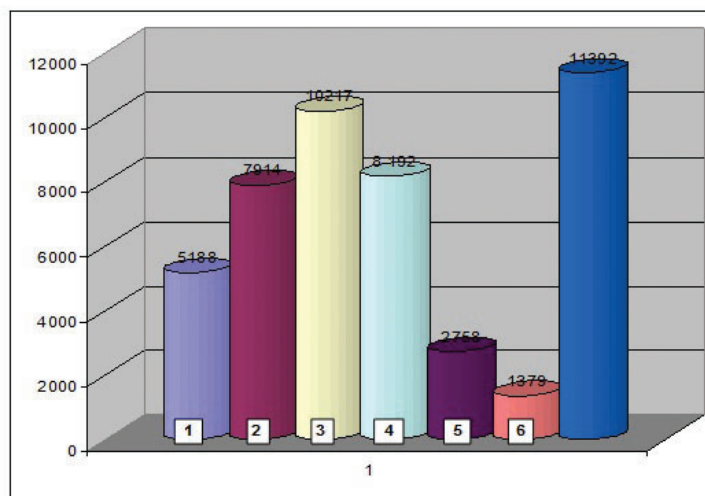


Рис. 1. Результаты обнаружения ДНК вируса ИРТ, культивируемого в клетках МДВК, после облучения низкоинтенсивным лазерным излучением (Примечание: 1 – 1,0 минута до заражения; 2 – 1,5 минуты до заражения; 3 – 2,0 минуты до заражения; 4 – 1,0 минута после заражения; 5 – 1,5 минуты после заражения; 6 – 2,0 минуты после заражения; 7 – контроль)

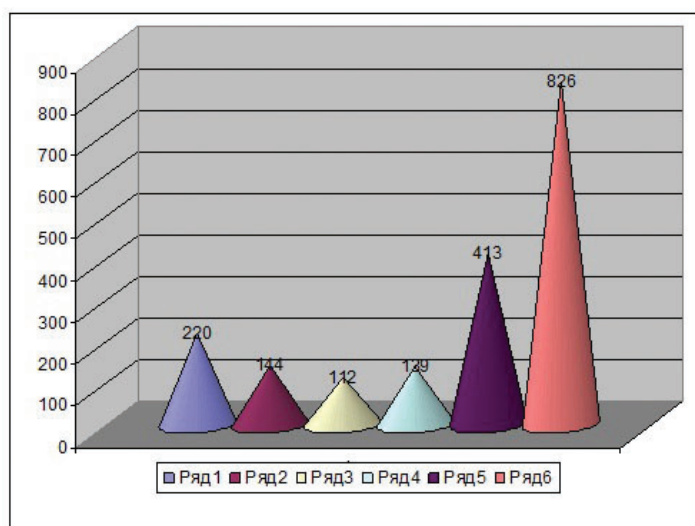


Рис. 2. Влияние облучения низкоинтенсивным лазерным излучением на угнетение репродукции вируса ИРТ в культуре клеток МДВК (Примечание: 1 – 1,0 минута до заражения; 2 – 1,5 минуты до заражения; 3 – 2,0 минуты до заражения; 4 – 1,0 минута после заражения; 5 – 1,5 минуты после заражения; 6 – 2,0 минуты после заражения)

Из таблицы видно, что в культуре клеток без облучения при обычной репродукции вируса ИРТ выявлялось в ПЦР 11392,00+1938,12 копий ДНК. Но облучение клеточного монослоя низкоинтенсивным лазерным излучением в течение 1 минуты в ПЦР выявлялось 5188,00+1959,71 копий ДНК (степень угнетения составляла 220 %), при облучении 1,5 минуты выявлено 7913,67+1350,74 копий ДНК (угнетение – 144 %), при облучении 2,0 минуты – 7662,50+107,37 копий (112 %). Но облучение после заражения показало обратный процесс: облучение 1 минута – 8182,00+3228,43 копий (139 %), 1,5 минуты – 2758,00+1104 копий (413 %), 2,0 минуты – 1379,50+228,5 (826 %). Полученные данные свидетельствуют, что увеличение экспозиции до заражения снижает противовирусный эффект, но увеличение экспозиции после заражения – существенно угнетает репродукцию вируса.

Эти данные в некоторой степени объясняют воздействие лазерного излучения на репродукцию вируса инфекционного ринотрахеита в системе *in vivo*, т.е. при облучении происходит активизация чувствительных клеток, приводящая к понижению проникновения вируса в чувствительные клетки.

Физическое воздействие на живую клетку в системе *in vitro* и *in vivo* будет влиять на размножение вирусов – как угнетать, так и стимулировать репродукцию.

Под воздействием низкоинтенсивного лазерного излучения в клетках происходит образование нитрозильных комплексов гемопротеинов (высвобождение NO под действием света из комплекса с гемоглобином и последующее связывание NO с цитохром-с-оксидазой, сопровождающееся модуляцией ее активности) и выделение молекулярного кислорода (образование за счет поглощения квантов света молекулами синглетного кислорода, способного вызывать структурные перестройки водной фазы).

В этой связи можно сделать вывод, что поляризованное излучение (полихроматическое поляризованное излучение или лазерное излучение) способствует активизации механизмов противовирусного действия самой клетки (активизация протеаз клетки, выделение O и молекулярного кислорода) на 1 и 2 стадии репродукции вируса – адсорбции вириона на клеточной мембране и проникновении его в клетку, а также на стадию депротенинизации вириона и «раздевание» нуклеопротеида. Все это позволяет получить высокий противовирусный эффект поляризованного излучения.

Список литературы

1. Бриль Г.Е., Бриль А.Г. Гуанилатциклаза и NO-синтетаза – возможные первичные акцепторы энергии низкоинтенсивного лазерного излучения / Г.Е.Бриль, А.Г. Бриль // Лазерная медицина. 1997. Т.1, вып.2. С.39-42.
2. Бриль, Г.Е. Новые данные об изменении структуры биожидкостей под влиянием низкоинтенсивного лазерного излучения/ Г.Е.Бриль, В.И.Петросян, Э.А.Житенева, Н.И.Синицын, В.Ф. Киричук, Л.А. Мартынов // Физическая медицина. 1996. Т.5, №1-2. С.39-40.
3. Гамалея, Н.Ф. Механизм лазерной биостимуляции – факты и гипотезы / Н.Ф.Гамалея, Е.Д. Шишко, Ю.В. Яниш // Изв. АН СССР. Сер. физич. 1986. Т.50, №5. С.1027-1032.
4. Behreus, B.J. Physikal Agents: Theori and practice/ B.J. Behreus, S.L. Micholovitz. – Philadelphia, 1998. – 23 S.

THE RESULTS OF THE STUDY OF ANTIVIRAL ACTION OF LASER RADIATION

Krosochko P.A., Borisovets D.S., Tchaikovsky P.S.

Republican Research Unitary Enterprise «Institute of Experimental Veterinary Medicine S.N. Vyshelesskogo», Minsk, Republic of Belarus

Plawsky V.Y.

State Scientific Institution «Institute of Physics National Academy of Sciences of Belarus», Minsk, Republic of Belarus

Krosochko P.P.

Educational Establishment «Vitebsk Order» Badge of Honor «State Academy of Veterinary Medicine», Vitebsk, Republic of Belarus

The purpose of the real research was studying of a reproduction of a virus of infectious rhinotracheitis of cattle against influence low intensity-go laser radiation. The scientific importance of article consists that in material results of the oppressing action of low-intensive laser radiation on a reproduction of a virus of infectious rhinotracheitis of cattle are for the first time given in the intertwined culture of cages of MDBK. For an assessment of degree of a reproduction of a virus it is used chain reaction in real time. The received results testify that radiation of a monolayer of culture of cages low-intensive laser radiation leads to oppression of a reproduction of a virus of infectious rhinotracheitis. It is characteristic that preliminary radiation oppresses a reproduction quantity of a virus, i.e. the increase in an exposition to infection reduces antiviral effect with 220 to 122 % whereas the increase in an exposition of radiation after infection oppresses a virus reproduction – with 139 to 826 % more significantly. It testifies that low intensity laser radiations are made active by a metabolism of cages, interferes with penetration of a virus into a cage and by that there is an oppression of its reproduction.

Keywords: low-intensive laser radiation, the virus of infectious bovine rhinotracheitis, cell culture, polymerase chain reaction.