

УДК 619:57.083.35

<https://doi.org/10.47612/2224-168X-2021-2-31-39>**Борисовец Д.С.**, кандидат ветеринарных наук, доцент¹**Зуйкевич Т.А.**, кандидат сельскохозяйственных наук¹**Згировская А.А.**, кандидат биологических наук¹**Красочко П.А.**, доктор ветеринарных наук, доктор биологических наук, профессор²**Осипенко А.Е.**, младший научный сотрудник¹¹РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышеселеского», г. Минск²УО «Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины», г. Витебск

ПОЛУЧЕНИЕ ТРАНСОВАРИАЛЬНЫХ ИММУНОГЛОБУЛИНОВ ПРИ СОЗДАНИИ НОВЫХ ВЕТЕРИНАРНЫХ БИОПРЕПАРАТОВ

Резюме

В статье предложены способы получения трансовариальных иммуноглобулинов для создания ветеринарных биопрепаратов нового поколения. В процессе исследований определен наиболее эффективный метод выделения трансовариальных иммуноглобулинов – с использованием органических растворителей, а также наиболее оптимальный способ их очистки путем осаждения с использованием ПЭГ-6000, позволяющий получить максимальный результат при сравнительно небольших затратах. Представлены результаты исследования структурных и функциональных особенностей полученных желточных иммуноглобулинов кур-несушек IgY в сравнительном аспекте.

Ключевые слова: трансовариальные иммуноглобулины, биопрепараты, животные, антитела, штаммы вирусов и бактерий.

Summary

The methods of obtaining of transovarial immunoglobulins for the development of veterinary biological preparation of a new generation are shown in the article. In the process of the research, the most effective method of isolating of transovarial immunoglobulins was determined - the method using organic solvents, and also the most optimal way to purify them by precipitation using PEG-6000, which allows to obtain the maximum result at relatively low cost. The results of the study of structural and functional features of the obtained yolk immunoglobulins of laying hens IgY in a comparative aspect are presented.

Keywords: transovarian immunoglobulins, biological products, animals, antibodies, strains of viruses and bacteria.

Поступила в редакцию 18.10.2021 г.

ВВЕДЕНИЕ

На сегодняшний день одним из перспективных направлений при разработке новых ветеринарных препаратов является применение специфических иммуноглобулинов, способных образовывать комплексы антиген-антитело с наиболее распространенными возбудителями энтеритов с последующей их нейтрализацией и выведением из организма [1].

Наиболее изученным классом иммуноглобулинов у млекопитающих является иммуноглобулин класса G (IgG). Его молекулярная структура и функции хорошо изу-

чены. В середине XX века птичьи иммуноглобулины обозначались также IgG. Но в настоящее время известно, что птичьи иммуноглобулины отличаются от IgG млекопитающих по структуре и функциям. Поэтому было принято решение называть их IgY (от слова «yolk» – желток). Сывороточные иммуноглобулины птиц полностью идентичны желточным. Концентрация IgY в желтке сопоставима с концентрацией IgY в сыворотке и составляет 6–13 мг/мл. Большое количество IgY, которое можно получить неинвазивным способом, делает кур идеальным поставщиком специфических

антител. Из-за значительной филогенетической дистанции, отделяющей птиц от млекопитающих, иммунологические свойства IgY сильно отличаются от IgG. Так, IgY не взаимодействуют с компонентами комплемента млекопитающих, ревматоидным фактором и Fc-рецепторами млекопитающих, следовательно, IgY-антитела не взаимодействуют с эффекторами иммунной системы млекопитающих и не вызывают системных осложнений при лечении [2].

В практическом аспекте такие свойства IgY, как его высокая концентрация в желтке, неспособность связывать белки А и G, активировать систему комплемента и интерферировать с IgG млекопитающих, привели к разработке так называемой IgY-технологии – альтернативе традиционному методу получения поликлональных антител на животных [3, 4, 5, 6].

Использование IgY для пассивной иммунизации имеет отличительные преимущества по сравнению с IgG млекопитающих:

- возможность получения большого количества антител (от одной курицы за месяц можно получить в 15–17 раз больше иммуноглобулинов, чем от одного кролика). По разным данным, желток куриного яйца содержит IgY в высокой концентрации (8–20 мг/мл). Это обусловлено легким переходом сывороточных антител в белок яйца, находящегося в яичнике, далее происходит активный перенос и аккумуляция IgY в желточном мешке;

- IgY-антитела обладают в 5 раз большим сродством к конкретному антигену и реагируют быстрее, чем IgG млекопитающих;

- выделение IgY происходит через бескровный физиологический процесс (кладка яиц), тогда как для извлечения IgG необходимо кровопускание, из-за чего животное испытывает боль;

- IgY не взаимодействуют ни с компонентами комплемента, ни с ревматоидным фактором, ни с Fc-рецепторами клеток млекопитающих. Кроме того, расходы на содержание птиц значительно ниже, чем на содержание крупных млекопитающих (лошадей, ослов, мулов, коров), часто

используемых для пассивной иммунизации.

Указанные преимущества IgY-технологий создают предпосылки для более широкого применения птичьих антител в научных исследованиях, диагностике и иммунотерапии инфекционных заболеваний молодняка сельскохозяйственных животных [1].

Целью данной работы является получение трансовариальных иммуноглобулинов и изучение их структурных и функциональных особенностей.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Работа выполнялась на базе отдела вирусных инфекций, отдела болезней птиц и физико-химических исследований РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского», вивария института.

При работе над получением трансовариальных иммуноглобулинов использовали 10 кур-несушек в возрасте 120–160 дней, которых разделили на 2 группы (опытную и контрольную) по 5 птиц в каждой. Куры были подвергнуты гипериммунизации по ранее отработанной схеме, включающей введение вирусных антигенов с адъювантом Montanide IMS 1313 VG в дозе 0,5 см³ внутримышечно в область грудной мышцы четырехкратно с интервалом 10–14 суток.

В качестве антигенов для гипериммунизации кур использованы следующие штаммы:

- штамм вируса диареи крупного рогатого скота «КМИЭВ-V120», депонированный в коллекции микроорганизмов РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского» (РНК-содержащий, представлен 1-нитевой РНК). Вирус использован в виде вирусосодержащей взвеси, полученной в перевиваемой культуре клеток почки эмбриона крупного рогатого скота MDBK с инфекционным титром 6,5 lg TCID₅₀/мл;

- штамм вируса диареи крупного рогатого скота «КМИЭВ-V120» – РНК-содержащий, представлен 1-нитевой РНК. Ис-

пользован в виде вирусосодержащей взвеси с инфекционным титром $6,5 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{мл}$. Вирус поддерживали в серийных пассажах и титровали на перевиваемой культуре клеток почки эмбриона крупного рогатого скота MDBK;

- штамм коронавируса крупного рогатого скота «КМИЭВ-V122» – РНК-содержащий, содержит положительно заряженную 1-цепочечную несегментированную полиаденилированную РНК. Использован в виде вирусосодержащей взвеси с инфекционным титром $5,25 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{мл}$. Вирус поддерживали в серийных пассажах и титровали на культуре клеток MDBK;

- штамм вируса инфекционного ринотрахеита крупного рогатого скота «КМИЭВ-V122» – ДНК-геномный, содержит непрерывную линейную 2-спиральную ДНК. Использован в виде вирусосодержащей взвеси с инфекционным титром $6,75 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{мл}$. Вирус поддерживали в серийных пассажах и титровали на культуре клеток MDBK;

- штамм ротавируса крупного рогатого скота «КМИЭВ-116» – РНК-содержащий, диаметр вириона 70–75 нм, нуклеиновая кислота представлена 11 сегментами 2-нитевой РНК. Использован в виде вирусосодержащей взвеси с инфекционным титром $7,0 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{мл}$. Вирус поддерживали в серийных пассажах и титровали на культуре клеток СПЭВ;

- штаммы бактерий *Escherichia coli* с адгезивными антигенами K88 (F4), K99 (F5), A20 (F17). Концентрация бактериальных клеток – 500 млн/мл. Среда культивирования – бульон Хоттингера.

Штаммы вирусов и бактерий инактивированы формалином в концентрации 0,2 % и смешаны в соотношении 1:1:1:1:1.

Первым этапом выделения иммуноглобулинов IgY из желтка яиц было отделение липидных компонентов желтка (липидов и липопротеинов).

Для определения наиболее эффективного способа получения водорастворимой IgY-содержащей фракции из яичных желтков было использовано 3 основных метода удаления липидов:

1) С использованием органических растворителей. Для этой цели была изготовлена органическая смесь следующего состава: хлороформ + этанол + 2-пропанол + фосфатно-солевой буфер (ФСБ) + этилацетат, взятые в процентном (v/v) соотношении 21,6:6,5:36:18:18 соответственно. Процедура выделения выполнялась с соблюдением правил асептики. Куриные яйца промывали водой и обрабатывали изопропиловым спиртом. Яичную скорлупу вскрывали, отделяли желток от белка и помещали на фильтровальную бумагу. Перекатывая желток на бумаге, максимально удаляли остаток белка. Затем оболочку желтка прокалывали ланцетом или кончиком пипетки, и желток помещали в пробирки вместимостью 50 мл. К желтку добавляли смесь в количестве, равном 2 объемам желтка. Содержимое пробирки интенсивно перемешивали, и пробирки в горизонтальном положении помещали на качалку при комнатной температуре на 20 мин, затем центрифугировали при 2500 об/мин в течение 20 мин.

2) С использованием 3,5%-ного полиэтиленгликоля [5]. Эквивалентный объем буфера (0,01 М фосфат натрия, 0,1 М NaCl, pH 7,5) добавляли к желтку и перемешивали. Твердый полиэтиленгликоль-6000 (Sigma) добавляли до концентрации 3,5 %, перемешивали до полного его растворения и образовавшийся осадок белка осаждали центрифугированием при 10000 об/мин в течение 15 мин. Супернатант фильтровали через фильтровальную бумагу и декантировали в другую пробирку для центрифугирования и дальнейшей очистки IgY.

3) Комбинированный метод в соответствии с [5, 7]. Яичный желток разбавляли 1:2 дистиллированной водой, гомогенизировали в течение 30 с и пропускали через фильтровальную бумагу. Смесь перемешивали с двумя объемами декстрана в концентрации 0,01 %. Полученную смесь оставляли на 30 мин при комнатной температуре, затем центрифугировали при 12000 об/мин в течение 15 мин. Супернатант пропускали через фильтровальную

бумагу и декантировали в другие пробирки для центрифугирования. Для полного удаления липида к надосадочной жидкости добавляли 3,5 % ПЭГ-6000 и перемешивали до растворения. Смесь центрифугировали при 12000 об/мин в течение 15 мин, чтобы осадить остаточный осадок липопротеина. Супернатант пропускали через фильтровальную бумагу для удаления остатков липидов и декантировали в другую центрифужную пробирку для дальнейшей очистки IgY.

На втором этапе было необходимо определить наиболее оптимальный метод очистки иммуноглобулинов от водорастворимой фракции желтка яиц. Для этого было апробировано 3 метода: осаждение, хроматографический метод и ультрафильтрация.

Для выполнения метода осаждения верхнюю водорастворимую фазу желтка яиц отбирали шприцем, переносили в чистые пробирки вместимостью 50 мл с последующим добавлением 2 объемов ФСБ. Для приготовления ФСБ навеску $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12\text{H}_2\text{O}$ массой 2,689 г помещали в мерную колбу вместимостью 1 л, растворяли в 600 мл дистиллированной воды. Затем, последовательно растворяя, вносили в эту же колбу навеску $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ массой 0,388 г и навеску NaCl массой 5,852 г. Объем раствора доводили до метки дистиллированной водой. Далее в пробирки вносили 12 % (w/v) сухого измельченного ПЭГ-6000 и интенсивно перемешивали до полного растворения. Через 20 мин precipitiрующие иммуноглобулины осаждали центрифугированием при 2500 об/мин в течение 20 мин. Супернатант декантировали. Осадок растворяли в ФСБ в объеме, равном первоначальному объему желтка.

Для проведения гидрофобной хроматографии водный супернатант желтка яиц вносили в колонку с фенил-сефарозой CL-4B (Sigma) 2 мг белка/мл геля. Для удаления несвязанного материала колонку промывали физиологическим раствором с фосфатным буфером (ФБР, разбавленный 1/10 дистиллированной водой). Элюирование проводили деминерализованной водой.

Элюированные белки подвергали замораживанию при температуре минус 20 °C.

Для проведения последующей гель-фильтрации белки ресуспендировали в ФБР, содержащем 0,02 % NaN_3 , пропускали через мембранный фильтр 0,2 мкм и вносили в колонку, содержащую Сефарил S-300 Superfine (Sigma), уравновешенную ФБР+0,02 % NaN_3 . В результате была собрана фракция белка с молекулярной массой 175 кДа.

Ультрафильтрацию проводили с использованием мембран XM 300 кДа, PM 30 кДа или YM 100 кДа для разделения водорастворимой фракции иммуноглобулинов по молекулярному весу 300, 30 и 100 кДа соответственно. Ультрафильтрация проводилась при температуре плюс 4–6 °C.

Концентрацию белка (иммуноглобулинов) определяли путем измерения оптической плотности растворов при 280 нм, используя 1%-ный раствор БСА в качестве стандарта.

Наличие птичьих иммуноглобулинов (IgY) во фракции выделяемых иммуноглобулинов определяли прямым методом иммуноферментного твердофазного анализа (ELISA) с использованием коммерческих кроличьих антикуриных IgG, конъюгированных с пероксидазой хрена. Анализ проводили следующим образом: микротитрующие планшеты на 96 лунок покрывали иммуноглобулинами путем последовательного разведения фракции иммуноглобулинов каждого образца с шагом, равным 2, в карбонатно-бикарбонатном буфере (100 мМ) при pH 9,6. Планшеты выдерживали в течение ночи при температуре плюс 4 °C. Далее планшеты трижды промывали фосфатно-солевым буфером, содержащим 0,1%-ный раствор (w/v) детергента Tween 20. Для блокировки неспецифической сорбции кроличьих конъюгатов IgG использовался 1%-ный раствор БСА. Связавшиеся конъюгаты проявляли тетраметилбензидином в присутствии перекиси водорода.

Оптические плотности ферментативной реакции регистрировали при 450 нм.

Далее для решения поставленной задачи были проведены исследования структурных и функциональных особенностей трансовариальных иммуноглобулинов в сравнительном аспекте полученных желточных иммуноглобулинов кур-несушек IgY и иммуноглобулинов кроликов IgG.

Для получения иммуноглобулинов класса Y (IgY) куры-несушки в возрасте 120–160 дней (4 птицы) были подвергнуты гипериммунизации по схеме, включающей введение антигена вируса диареи (штамм «КМИЭВ-V120», депонированный в музее штаммов микроорганизмов РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского»), инактивированного формалином в 0,2%-ной концентрации, эмульгированного в масляном адъюванте, в дозе 0,5 см³ внутримышечно в область грудной мышцы четырехкратно с интервалом 10–14 суток.

Для получения иммуноглобулинов класса G (IgG) 4 кроликов живой массой 2,5–3,0 кг иммунизировали по аналогичной схеме внутримышечно в область бедра.

Через 14 дней после последней иммунизации у кроликов отбирали пробы крови, у кур-несушек – пробы крови и яйца с целью получения иммуноглобулинов классов G и Y соответственно. При этом оценивали показатель интенсивности накопления иммуноглобулинов в крови кроликов в сравнении с уровнем накопления в яйцах и крови кур-несушек. Степень накопления специфических антител определяли в реакции нейтрализации.

Для получения из желтка яиц IgY было проведено отделение липидных компонентов желтка (липидов и липопротеинов). Получение водорастворимой IgY-содержащей фракции из яичных желтков проводили методом удаления липидов с использованием органических растворителей.

Дальнейшее изучение при получении препаратов на основе трансовариальных иммуноглобулинов для молодняка крупного рогатого скота должно учитывать высушивание яичных желтков при температуре плюс 70–90 °C, а также пероральное применение готового препарата, предполагающее воздействие на него аг-

рессивных сред желудка (соляной кислоты и протеолитических ферментов).

В связи с этим были изучены структурные и функциональные особенности трансовариальных иммуноглобулинов под влиянием температуры, pH и протеолитических ферментов в сравнении с иммуноглобулинами млекопитающих, а также влияние на них стабилизаторов (сорбитола, каррагинана, глюкозы, маннита и др.).

Для оценки влияния pH среды готовили 0,2%-ный раствор IgY на забуференном растворе натрия хлорида. В качестве стабилизаторов к раствору IgY добавляли растворы D-сорбитола, каппа-каррагинана, D-глюкозы, D-маннита, микрокристаллической целлюлозы (МКЦ) в 30%-ной концентрации; pH среды доводили с помощью раствора соляной кислоты от 2 до 7. Полученный раствор инкубировали при температуре плюс 37 °C. После инкубации при каждом pH раствор нейтрализовали с помощью ФБР, содержащий 0,05%-ный Твин 20. После этого изучали активность IgY.

Для изучения влияния температуры раствор IgY (концентрация 1 мг/мл) нагревали при температурах плюс 50, 60, 70, 80 или 90 °C на водяной бане в течение 30 мин в присутствии D-сорбитола, каппа-каррагинана, D-глюкозы, D-маннита и МКЦ в концентрации 30 %. Активность IgY изучали в реакции нейтрализации.

Влияние протеолитических ферментов на IgY (концентрация 1 мг/мл) проводили при осторожном встряхивании (температура плюс 37 °C). Иммуноглобулины IgY разбавляли в 0,2 М-ацетатном буфере (pH 2,5) для пепсина и 0,2 М-Трис-HCl-буфере (pH 7,5) – для трипсина в присутствии D-сорбитола, каппа-каррагинана, D-глюкозы, D-маннита и МКЦ в концентрации 30 %, а также с добавлением желтка и белка яиц. Конечное соотношение по массе фермента к субстрату – 1:20. Расщепление пепсином проводили при температуре плюс 37 °C в течение 2 ч, трипсином – в течение 4 ч при той же температуре. Реакцию останавливали добавлением 2М трисоснования или фенилметилсульфонилфторида в изопропанол для пепсина и трипсина соответственно.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Результаты исследований по получению водорастворимой IgY-содержащей фракции из яичных желтков с использова-

нием методов обработки органическими растворителями с использованием 3,5%-ного полиэтиленгликоля и комбинированным методом представлены в таблице 1.

Таблица 1. – Средний выход иммуноглобулинов из желтков гипериммунизированных кур при различных способах выделения

Показатель	Метод выделения иммуноглобулинов		
	с использованием органических растворителей	с использованием 3,5%-ного полиэтиленгликоля	комбинированный метод
Средний выход иммуноглобулинов из 1 желтка, мг	87,5	63,8	74,2

По данным таблицы 1 наиболее эффективным способом выделения иммуноглобулинов является метод с использованием органических растворителей, позволяющий получить средний выход иммуноглобулинов из 1 яйца на уровне 87,5 мг.

Результаты исследований по апробированию метода осаждения, хроматографического метода и ультрафильтрации с целью очистки иммуноглобулинов из водорастворимой фракции желтка яиц представлены в таблице 2.

Таблица 2. – Средняя концентрация протеинов (мг/мл) из желтков яиц гипериммунизированных кур при использовании различных способов очистки трансовариальных иммуноглобулинов

Показатель	Методы очистки иммуноглобулинов		
	осаждение	хроматография	ультрафильтрация
Средняя концентрация иммуноглобулинов, мг/мл	18,1±0,15	18,8±0,4	20,0±0,7

По данным, представленным в таблице 2, при использовании менее дорогостоящего и трудозатратного метода осаждения средняя концентрация протеинов (трансовариальных иммуноглобулинов) на уровне 18,1±0,15 мг/мл не имела значимых различий в сравнении с хроматографическим методом (18,8±0,4 мг/мл) и ультра-

фильтрацией (20,0±0,7 мг/мл), что позволяет рекомендовать данный способ для использования в технологии производства трансовариальных иммуноглобулинов.

Результаты изучения интенсивности накопления иммуноглобулинов в крови кроликов, крови и яйце кур-несушек представлены в таблице 3.

Таблица 3. – Интенсивность накопления иммуноглобулинов в крови кроликов, крови и яйце кур-несушек

Группа животных	Биологический материал	Титры антител в РН, log ₂	
		до иммунизации	через 14 дней после последней иммунизации
Опытная группа (куры-несушки)	кровь	0	5,9±0,1*
	яйцо	0	4,8±0,25*
Опытная группа (кролики)	кровь	1,67±0,33	5,67±0,33*
Контрольная группа (куры-несушки)	кровь	0	0
	яйцо	0	0
Контрольная группа (кролики)	кровь	2,0±0	1,67±0,33

Примечание – *P≤0,001

По данным таблицы 3 применение разработанной схемы гипериммунизации приводило к достоверному ($P \leq 0,001$) увеличению титров специфических антител в организме иммунизированных кроликов и кур-несушек. При этом следует отметить, что уровень антител в крови и яйце кур-несушек ($5,9 \pm 0,1 \log_2$ и $4,8 \pm 0,25 \log_2$ соответственно) не имел достоверных различий в сравнении с данным показателем в организме кроликов ($5,67 \pm 0,33 \log_2$).

Из полученных в ходе опыта данных можно также сделать вывод о прямой

взаимосвязи между уровнем IgY к антигену в крови иммунизированных кур и полученных от них яйцах, при этом наблюдаются индивидуальные различия в титре антител, которые являются хорошим индикатором ожидаемой передачи этих антител потомству. Таким образом, уровень антител IgY яичного желтка к специфическим антигенам также является хорошим индикатором как титра антител у самок, так и передачи материнских антител потомству. Результаты оценки влияния pH среды на активность IgY представлены в таблице 4.

Таблица 4. – Влияние pH среды на активность IgY, полученных при гипериммунизации кур-несушек

Образец	Активность IgY, %					
	pH среды					
	2	3	4	5	6	7
IgY+D-сорбитол	60,4	63,8	69,6	84,6	95,4	100
IgY+каппагенан	59,5	63,2	68,4	83,4	95,2	100
IgY+D-глюкоза	10,3	45,8	72,6	87,1	95,8	98,8
IgY+D-маннит	7,8	35,0	48,7	78,5	96,7	98,9
IgY+МКЦ	11,3	46,6	54,7	76,3	93,4	99,6
IgY без стабилизатора	5,3	16,8	35,9	63,9	69,6	93,6

Из данных таблицы 4 видно, что наиболее интенсивное снижение активности IgY происходит при значениях pH от 2 до 4, при этом активность IgY падает на 64,1–94,7 %. Добавление стабилизаторов в 30%-ной концентрации позволяет повысить сохранность антител класса Y при агрес-

сивном воздействии кислой среды на 2,5–55,1 %. При этом наиболее высокие результаты получены при использовании в качестве стабилизатора D-сорбитола.

Результаты изучения влияния температуры на активность IgY представлены в таблице 5.

Таблица 5. – Влияние температуры на активность IgY, полученных при гипериммунизации кур-несушек

Образец	Активность IgY, %				
	температура, °C				
	50	60	70	80	90
IgY+D-сорбитол	100	95,8	78,9	6,8	2,3
IgY+каппагенан	92	78,2	32,4	3,2	0
IgY+D-глюкоза	100	84,6	72,6	3,4	0,2
IgY+D-маннит	95,3	73,9	16,5	3,6	0
IgY+МКЦ	98,6	74,0	20,3	5,6	0,3
IgY без стабилизатора	57,5	55,2	18,9	0,2	0

Данные таблицы 5 свидетельствуют о наиболее интенсивном снижении активности IgY при воздействии высоких температур (выше 70 °C). Активность IgY падает при этом на 81,1–100 %. Добавление стабилизаторов позволяет повысить сохранность антител класса Y при воздействии высоких температур на 13,5–60 %. При этом наиболее высокие результаты получены при использовании в качестве стаби-

лизаторов D-сорбитола и D-глюкозы, позволяющих сохранить активность IgY до 72,6–78,9 % при температуре 70 °C. При более высоких температурах активность IgY даже при добавлении стабилизаторов значительно снижается – на 93,2–96,8 %.

Результаты изучения влияния протеолитических ферментов на активность IgY представлены в таблице 6.

Таблица 6. – Влияние протеолитических ферментов на активность IgY, полученных при гипериммунизации кур-несушек

Образец	Активность IgY, %	
	ферменты	
	пепсин	трипсин
IgY+D-сорбитол	5,3	85,6
IgY+каррагенан	4,1	87,3
IgY+D-глюкоза	5,1	89,6
IgY+D-маннит	2,3	80,1
IgY+МКЦ	7,3	80,4
IgY+белок и желток яиц	39,5	100
IgY без стабилизатора	2,3	75,3

Результаты, представленные в таблице 6, показали, что под действием протеолитических (пищеварительных) ферментов наиболее интенсивное снижение активности IgY (на 92,7–97,7 %) происходит под влиянием пепсина, под воздействием трипсина этот показатель снижается только на 10,4–24,7 %.

При этом стоит отметить, что в сравнении с полисахаридами наиболее оптимальным является белоксодержащий стабилизатор на основе белка и желтка яиц, применение которого позволяет повысить сохранность антител IgY при воздействии пепсина и трипсина на 60,5 и 100 % соответственно.

ВЫВОДЫ

1. Наиболее эффективным методом выделения трансовариальных иммуноглобулинов является метод с использованием органических растворителей, позволяющий получить средний выход иммуноглобулинов из 1 яйца на уровне 87,5 мг, а наиболее оптимальным – способ их очистки путем осаждения с использованием ПЭГ-6000, позволяющий получить среднюю концентрацию протеинов (трансовариальных иммуноглобулинов) на уровне $18,1 \pm 0,15$ мг/мл.

2. Установлена прямая взаимосвязь между уровнем IgY к антигену в крови иммунизированных кур и полученных от

них яйцах, при этом наблюдаются индивидуальные различия в титрах антител, которые являются индикатором ожидаемой передачи этих антител потомству.

3. Добавление стабилизаторов в 30%-ной концентрации позволяет повысить сохранность антител класса Y при агрессивном воздействии кислой среды на 2,5–55,1 %. Наиболее высокие результаты (60,4–100 %) получены при использовании в качестве стабилизатора D-сорбитола.

4. Использование стабилизаторов повышает сохранность антител класса Y

при воздействии высоких температур на 13,5–60 %, при этом оптимальными стабилизаторами являются D-сорбитол и D-глюкоза, позволяющие сохранить активность IgY на уровне 72,6–78,9 % при температуре 70 °C.

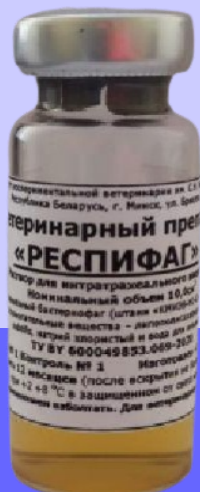
5. В сравнении с полисахаридами при воздействии пепсина и трипсина оптимальным является белоксодержащий стабилизатор на основе белка и желтка яиц, применение которого позволяет повысить сохранность антител IgY на 60,5 и 100 %.

ЛИТЕРАТУРА

1. Каплин, В. С. IgY-технологии в медицине. Желточные антитела птиц в иммунотерапии / В. С. Каплин, О. Н. Каплина // Международные обзоры: клиническая практика и здоровье. – 2016. – № 4. – С. 59–75.
2. Shofiqur Rahman, Faustino C. Icatlo and Nguyen Van Sa. // Austin J. Clin. Med. – 2014. – Vol. 1, № 3. – 1012 p.
3. Klimentzou, P. Development and immunochemical evaluation of antibodies Y for the poorly, immunogenic polypeptide prothymosin alpha / P. Klimentzou [et al.] // Peptides. – 2006. – Vol. 27. – P. 183–193.
4. Pauly, D. Monitoring of laying capacity, immunoglobulin Y concentration, and antibody titer development in chickens immunized with ricin and botulinum toxins over a two-year period / D. Pauly [et al.] // Poultry Science. – 2009. – Vol. 88. – P. 281–290.
5. Polson, A. Isolation of viral IgY antibodies from yolks of immunized hens / A. Polson, M. B. von Wechmar, M. H. van Regenmortel // Immunol. Commun. – 1980. – Vol. 9. – P. 475–493.
6. Witkowski, P. T. Gene gun-supported DNA immunisation of chicken for straightforward production of poxvirus-specific IgY antibodies / P. T. Witkowski [et al.] // Immunol. Methods. – 2009. – Vol. 341. – P. 146–153.
7. Hatta, H. A novel isolation method for hen egg yolk antibody, «IgY» / H. Hatta, M. Kim, T. Yamamoto // Agricultural and biological chemistry. – 1990. – Vol. 54, № 10. – P. 2531–2535.

**ПРЕПАРАТ
ВЕТЕРИНАРНЫЙ**

РЕСПИФАГ



для лечения и профилактики респираторных заболеваний молодняка крупного рогатого скота, вызванных **клебсиеллами**

изготовлен из клебсиеллезного бактериофага (штамм «КМИЭВ-V142») и вспомогательных веществ



WWW.BIEVM.BY