На правах рукописи

ВАСИЛЕВСКАЯ ЕКАТЕРИНА РОМАНОВНА

РАЗРАБОТКА КОРМОВОЙ ДОБАВКИ НА ОСНОВЕ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ ИЗ СЫРЬЯ ЖИВОТНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ

05.18.04 - Технология мясных, молочных и рыбных продуктов
и холодильных производств

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание степени

кандидата технических наук

Москва – 2019

Работа выполнена в Экспериментальной клинике-лаборатории биологически активных веществ животного происхождения Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный научный центр пищевых систем им. В.М. Горбатова» РАН (ФГБНУ «ФНЦ пищевых систем им. В.М. Горбатова» РАН).

Научный руководитель:	кандидат технических наук **Федулова Лилия Вячеславовна**
Официальные оппоненты:	**Абрамова Любовь Сергеевна** доктор технических наук, профессор, ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт рыбного хозяйства и океанографии», советник директора. **Сторублевцев Станислав Андреевич** кандидат технических наук, ФГБОУ ВО «Воронежский государственный университет инженерных технологий», кафедра технологии продуктов животного происхождения, доцент.
Ведущая организация:	Федеральное государственное бюджетное научное учреждение высшего образования «Поволжский научно-исследовательский институт производства и переработки мясомолочной продукции», г. Волгоград.

Защита диссертации состоится «17» октября 2019 г. в _____ ч. на заседании Диссертационного совета Д 006.021.02 при Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Федеральный научный центр пищевых систем им. В.М.Горбатова» РАН по адресу: 109316, г. Москва, ул. Талалихина, 26.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте ФГБНУ «ФНЦ пищевых систем им. В.М.Горбатова» РАН и www.vniimp.ru.

Автореферат разослан « __ » _____ 2019 г.

Ученый секретарь диссертационного совета, кандидат технических наук, старший научный сотрудник Захаров А.Н.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность работы. Ежегодное увеличение поголовья скота приводит к ухудшению экологической и эпизоотической обстановки во всем мире за счет повышения риска трофической передачи инфекционных и паразитарных заболеваний. Основные меры профилактики по снижению распространения инфекционных заболеваний, помимо улучшения условий содержания и рациона кормления животных, включают в себя вакцинацию и применение антимикробных препаратов, в том числе кормовых. При этом ненадлежащее использование антибиотиков в животноводстве приводит к увеличению риска развития зоонозов за счет возникновения и распространения антибиотикрезистентных патогенов [Chattopadhyay M.K., 2014; Ardolino M., 2014; Done H.Y., 2015; Thevenot P.T., 2014; Sun Z., 2017]. Нерациональное использование антибиотиков приводит к увеличению восприимчивости молодняка к инфекциям и замедлению темпов роста, возникновению дисбиозов, снижению прироста живой массы, в результате чего увеличивается процент мяса с пороками, снижается содержание эссенциальных нутриентов, нарушается баланс аминокислот и жирных кислот [D. Pighin, 2016; H. Hao et al., 2014]. Нельзя не отметить, что серьезной проблемой является рост антибиотикорезистентности у потребителей мяса таких животных. По этой причине в странах Европейского союза с 2006 года запрещено использование кормовых антибиотиков, взамен применяются натуральные кормовые добавки (в т.ч. фитобиотики).

Одним из путей снижения заболеваемости, повышения продуктивности и качества мясной продукции является укрепление общего неспецифического иммунного статуса животных посредством применения натуральных биоактивных веществ [Караулов А.В., 2015; Caspar Y., 2017; Meek R.W, 2015]. В связи с изложенным, поиск природных активных веществ, способствующих укреплению иммунного статуса продуктивных животных, выделенных из сырья животного происхождения, представляется актуальным.

Степень разработанности темы. На настоящий момент появляется все больше данных о стимуляторах неспецифического иммунитета природного

происхождения, в том числе адаптогенах и пептидах, выделенных из животных клеток и тканей. Иммуномодулирующие препараты эндогенного происхождения представлены, преимущественно, монопрепаратами – иммунорегуляторными пептидами и цитокинами, выделенными из тимуса, костного мозга и селезенки молодняка или эмбрионов свиней и крупного рогатого скота. Сегодня на рынке представлены три поколения иммуномодулирующих пептидов тимуса и костного мозга. К препаратам 1-го поколения относятся экстракты, содержащие нативные полипептиды с молекулярной массой от 1 до 5 кДа; препараты 2-го и 3-го поколений представляют собой синтетические аналоги α- тимозина и тимопоэтина или фрагменты этих веществ. Однако подобные иммуномодуляторы направленного действия для сельскохозяйственных животных отсутствуют. По этой причине, одним из возможных путей решения существующей проблемы является разработка кормовых добавок на основе биоактивных веществ из иммунных органов животных.

Работами в области исследования и разработки технологий биологически активных веществ (БАВ) животного происхождения, а также разработкой методов их исследования занимались такие ученые как В. Х. Хавинсон, О.В. Коркушко, В.Б. Шатило, В.В. Нероев, С.В. Трофимова, Ю.Ю. Осокина, В. В. Малинин и др.

Исследования последних лет показали важность выбора экстрагента при получении биоактивных соединений из природного сырья. Имеются данные, косвенно указывающие на зависимость скорости протекания реакций в экстракционной системе от концентрации дейтерия. В виду чего интересным представляется изучение возможности применения воды с модифицированным изотопным D/H составом (ВМИС) для получения биомолекул из иммунных органов свиньи.

Отдельные этапы настоящей диссертационной работы выполнены в рамках:

– плана НИР ФГБНУ «ФНЦ пищевых систем им. В.М. Горбатова» РАН в рамках тем № 013.02 «Выделить и изучить биологически активные вещества, полученные из малоценного сырья животного происхождения, обладающие коррегирующим действием при различных патологических состояниях человека,

с целью создания на их основе природных лечебно–профилактических средств» (2013–2015 гг.) и № 013.01 «Разработать научные основы применения альтернативных методов биомоделирования для изучения корригирующих свойств функциональных ингредиентов, добавок и продуктов питания с заявленными коррегирующими свойствами» (2015–2017 гг.);

– гранта Российского научного фонда по теме « Разработка инновационных природных стимуляторов неспецифического иммунитета адаптогенного действия на основе видо- и тканеспецифичных биомолекул», соглашение № 15–16–00008 от 13.05.2015 г (2015-2019 гг.).

Целью настоящей работы является разработка технологии переработки иммунных органов свиней для создания кормовой добавки, способствующей повышению адаптогенного потенциала у сельскохозяйственных животных.

Задачи исследования:

1. Определить экспериментальными методами ключевые параметры выделения целевых белковых веществ, в том числе экстракции, разделения и концентрирования.
2. Изучить выделенные белковые фракции, выявить и идентифицировать биологически активные вещества.
3. Разработать комплекс методов оценки биологических свойств целевых веществ методами in vitro, ex vivo и in vivo.
4. Разработать технологию кормовой добавки, обеспечивающую сохранность активных веществ, подтвердить ее эффективность и безопасность и оценить экономическую эффективность производства кормовой добавки.

Научная новизна. Идентифицированы биоактивные белковые компоненты разработанной кормовой добавки на основе иммунных органов свиньи.

Научно обосновано применение солюбилизирующего агента на основе воды с пониженной концентрацией дейтерия (ВМИС) для выделения биологически активных веществ.

Сформирован комплекс методов оценки биологических свойств кормовой добавки, включающий исследования мембранотропной активности in vitro на

модели кислотного гемолиза, определения органотропности ex vivo на эксплантатах тканей крыс и оценки иммуностимулирующей активности in vivo на лабораторных крысах с моделью иммунодефицита.

Изучена способность разработанной природной кормовой добавки к поддержанию иммунного статуса и адаптационных возможностей продуктивных животных, способствующая повышению сохранности поголовья, интенсивности роста животных и улучшению качества животноводческой продукции.

Теоретическая и практическая значимость работы. Научно обоснована и разработана технология кормовой добавки на основе биологически активных веществ, полученных из иммунных органов свиньи с применением воды с пониженной концентрацией дейтерия. Подобраны методы контроля процессов экстракции, очистки и концентрирования биологически активных веществ из иммунных органов свиньи.

Методология и методы исследования. Использованы методы выделения и концентрирования биоактивных веществ (экстракция и ультрафильтрация), физико-химические (электрофоретические и масс-спектрометрические) методы для анализа и идентификации биологически активных веществ; биохимические и биологические методы, включая методы in vitro, ex vivo и in vivo, для оценки биологических свойств и безопасности кормовой добавки.

Положения, выносимые на защиту:

1. Обоснование возможности и условий использования воды с пониженным содержанием дейтерия в качестве экстрагента, что позволяет увеличить выход биоактивных веществ из селезенки на 20 %, тимуса на 38 % и мезентеральных лимфатических узлов на 35 %.

2. Выявлена специфичность действия идентифицированых целевых биоактивных вещества белковой природы с молекулярными массами менее 30 кДа (в том числе альфа-тимозин, интерферон бета протеин, гамма- интерферон индуцируемая лизосомальная тиол-редуктаза, миелоидный дифференцирующий белок первичного иммунного ответа, интерлейкин-12 субъединица бета; аннексин

A1 и др.) – показано увеличение пролиферативной активности и резистентности эритроцитарной мембраны.

3. Разработана технология кормовой добавки, способствующая увеличению мембрано- и органотропности целевых биоактивных компонентов.

4. В исследованиях in vivo показано воздействие целевых компонентов кормовой добавки на иммунную систему: стимуляция выработки цитокинов, в том числе IgG до 16 %; IgM до 24 %; Il-2 и Il-6 до 10 %, и активация каскада комплементарного звена (увеличение C1q до 10 %, при уменьшении C4 до 13 %).

5. Разработанная технология позволяет получить эффективную малотоксичную (согласно ГОСТ 32644 можно отнести к 5 классу) и низкоаллергенную кормовую добавку.

Степень достоверности и апробация работы. Результаты выполненной работы и их достоверность подтверждается корректным использованием теоретических и экспериментальных методов обоснования полученных результатов, выводов и рекомендаций. Использование современных средств и методик проведения исследований обеспечивает достоверность экспериментальных данных. Теоретические положения основаны на известных достижениях как фундаментальных, так и прикладных научных дисциплин, связанных с предметом исследования.

Результаты исследования доложены на: Международной научно-практической конференции, посвященной памяти Горбатова В.М. (г. Москва, 2015 г); III Всероссийской научно-практической конференции "Биотехнология: наука и практика" (г. Ялта, 2015 г); Международной научно-практической конференции молодых учёных и специалистов отделения сельскохозяйственных наук РАН (г. Москва, 2016 г); X Международная конференция молодых ученых и специалистов ФГБНУ «ВНИИМП им. В.М. Горбатова» (г. Москва, 2016 г); Conference Series LLC Joint International Event on 5th European Immunology & Innate Immunity (г. Берлин, 2016); XIV Scientific conference with international participation «Food safety and control» (г. Пьештьяны, 2017 г); Международной научно-практической конференции, посвященной памяти академика РАН Сизенко

Е.И. «Экологические, генетические, биотехнологические проблемы и их решение при производстве и переработке продукции животноводства» (г. Волгоград, 2017); Международной конференции «Новые информационные технологии в медицине, биологии, фармакологии и экологии» (г. Ялта, 2016, 2017, 2019 гг).

Публикации

По теме диссертации опубликовано 24 печатные работы, из них 9 – в журналах, входящих в перечень ВАК РФ, 5 публикаций входят в WOS и Scopus.

Личный вклад соискателя

Все изложенные в диссертации результаты получены автором самостоятельно или при его непосредственном участии. Постановка задач, интерпретация полученных результатов осуществлялись совместно с научным руководителем и другими соавторами публикаций. Диссертантом была проведена разработка схемы исследования (91 %), осуществлен обзор источников литературы, лично выполнены лабораторные исследования, а также обработка полеченных результатов (100 %). Соискатель разрабатывал технологию выделения целевых белковых соединений (95 %), непосредственно участвовал в формулировании выводов и научных положений, написании статей (83 %) и тезисов (95 %), подготовил текст и оформил иллюстративный материал для диссертации (96%).

Объём и структура диссертации

Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, результатов исследования, заключения и выводов. Список литературы содержит 132 источника, из них 30 российских и 102 зарубежных. Объем работы составляет 109 страниц машинописного текста, содержит 13 рисунков и 24 таблицы.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во введении обоснована актуальность, научная новизна, практическая значимость работы и положения, выносимые на защиту.

В главе 1 представлен анализ отечественной и зарубежной литературы по теме диссертационной работы, отображены современные представления о

влиянии иммунного статуса животных на качество продукции и защитных факторах неспецифического иммунитета, обзор существующих природных и синтетических биологически активных веществ для профилактики и коррекции иммунной системы, рассмотрены современные технологии природных ветеринарных средств на основе животного сырья. Анализ публикаций позволил определить цель и сформулировать задачи исследования.

В главе 2 определены объекты исследования, представлены методологические подходы к проведению исследований в виде схемы (Рис. 1). В качестве объектов исследования выбраны белковые соединения тканей тимуса, селезенки и мезентеральных лимфатических узлов (МЛУ) свиней., а также разработанная на их основе кормовая добавка. В работе использовали стандартные и общепринятые химические, физико-химические, биологические методы, а также методы статистической обработки результатов. Подбор технологии выделения биологически активных веществ осуществляли с использованием лабораторной диспергирующей установки – ЛДУ (Лаботекс, Россия), центрифуги СМ-6М (ELMI, Латвия), фильтрационной установки Владисарт (Владисарт, Россия) с использованием модулей VivaFlow200 (Sartorius, Германия).

Определяли: **массовую долю минеральных веществ (золы)** по ГОСТ 31727-2012 [1]; **массовую долю жира** по ГОСТ 23042-86 [2]; **массовую долю белка** по ГОСТ 25011-81 [3]; **общую концентрацию белка** – биуретовой реакцией [4]; **аминокислотный состав** - методом ионообменной хроматографии на анализаторе Aracus (PMAGmbH, Германия) [5]; **протеомный профиль** - одномерным (по Леммли) [6] и двумерным (по О'Фарреллу) электрофорезом с дальнейшей идентификацией белковых фракций методами MALDI-TOF MS и MS/MS масс-спектрометрии на MALDI-времяпролетном масс-спектрометре Ultraflex (Bruker, Германия), **биоинформатическим анализом** масс-спектров с помощью ПО Mascot/Peptide Fingerprint (Matrix Science, США), в соответствии с БД NCBI [7].

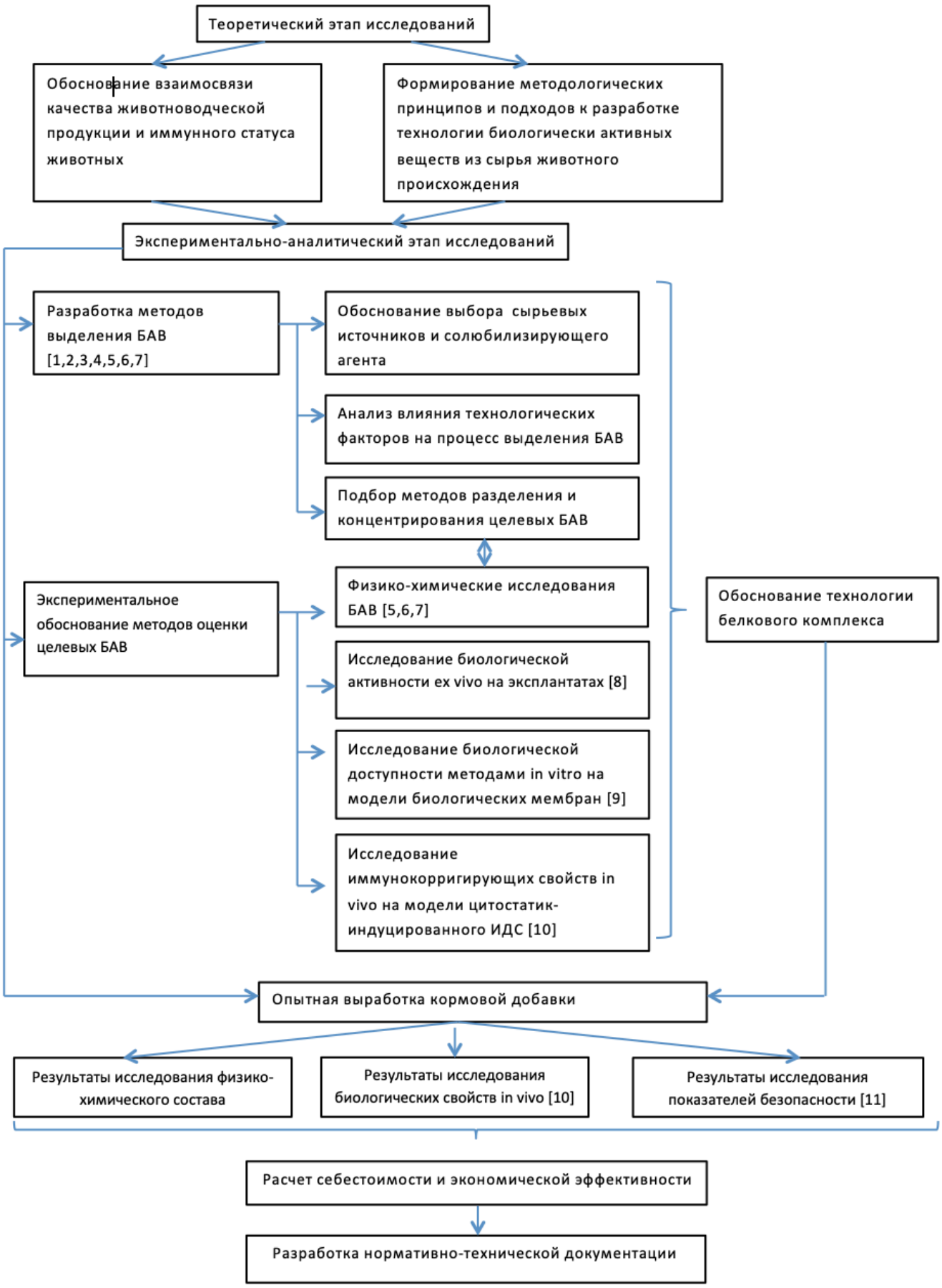


Рисунок 1 – Схема диссертационного исследования

Для изучения **биологических свойств** использованы методы: ***ex vivo*** - на эксплантатах тканей лабораторных крыс Wistar (spf) [8]; ***in vitro*** - на модели кислотного гемолиза эритроцитов лабораторных крыс Wistar (spf) [9]; ***in vivo*** - на лабораторных крысах Wistar (spf) с моделью цитостатик-индуцированного иммунодефицита (ИД) [10].

Животные были распределены на группы: 1 - контроль с ИД; 2 – интакт; 3 - ИД при введении экстракта ВМИС, 4 - ИД при введении фракции с Мм до 30 кДа экстракта ВМИС; 5 - ИД при введении фракции с Мм свыше 30 кДа экстракта ВМИС. Объекты вводили ежедневно в течение 14 суток внутрижелудочно из расчета: для экстракта – (50 ± 0,2) мг/кг белка, для фракции менее 30 кДа – (20 ± 0,2) мг/кг белка, для фракции более 30 кДа – (30 ± 0,2) мг/кг белка; животным 1-ой группы вводили воду в эквивалентном объеме. Оценивали показатели: количество лимфоцитов, гранулоцитов, моноцитов; содержание антител CD3+, CD4+, CD3/CD4 (на проточном цитофлуориметре Guava easyCyte (MerchMillipore, Франция)); иммуноглобулины M и G, интерлейкины 2, 4 и 6, компоненты комплемента (КК) C5, C3, C4, C1q, C1qA, C1qB, ЦИК (на анализаторе Immunochem 2100 (HTI, USA), используя наборы ELISA-rat). Для изучения биологических свойств кормовой добавки проводили аналогичный эксперимент in vivo. Исследование **безопасности** кормовой добавки проведено на крысах по ГОСТ 32644-2014, местно-раздражающего действия - на кроликах по ГОСТ 32436-2013 и сенсибилизирующего действия – на морских свинках по ГОСТ 32375-2013 [11]. Статистическую обработку проводили с использованием ПО "STATISTICA 10,0", вариационного анализа ANOVA в сочетании с тестом Дункана, уровень значимости – 0,05. Результаты представлены как M±SE.

В главе 3 приведен химический состав исследуемого сырья: показано высокое содержание жира в МЛУ (24,0 ± 1,9), высокое содержание белка в селезенке (18,9 ± 0,2), что обусловлено особенностями архитектоники данных органов. Приведено научное обоснование выбора сырьевых источников, режимов и технологических параметров выделения БАВ. Алгоритм выделения целевых биоактивных соединений включал водно-солевую экстракцию по схеме (Рис. 2), с

использованием ЛДУ при гидромодуле 1:5 и температуре 4°С с различным содержанием дейтерия в солюбилизирующем агенте (дистилированная вода D/H=140 ppm – ДВ, вода с пониженным содержанием дейтерия D/H=40 ppm – ВМИС), с контролем выхода белковых соединений в раствор.

Рисунок 2 - Алгоритм получения экстрактов на основе ВМИС и ДВ

При экстракции БАВ из селезенки максимальное содержание белка было достигнуто на 75 минуте эксперимента и составило в экстракте на основе ВМИС 25,5±0,2 г/л, на основе ДВ – на 20 % меньше (20,4±0,4 г/л). При экстракции тимуса на основе ВМИС максимальное содержание белка составило 18,9±0,2 г/л на 30 минуте эксперимента, на основе ДВ максимальное значение содержания белка было на 38 % ниже (11,7±0,3 г/л) на 45 мин экстракции. При экстракции МЛУ в физиологическом растворе ВМИС максимальное содержание белка составило 19,5±0,47 г/л на 75 мин эксперимента, на основе ДВ уровень белка достиг максимума на 45 минуте экстракции и был на 35 % ниже (12,6±0,38 г/л).

Аминокислотный анализ образцов (Рис. 3) выявил наличие значительного количества нейромедиаторных аминокислот, таких как аспаргиновая и глутаминовая кислоты, глицин (тимус - 10,5 %; 13,7 %; 7,6 %; селезенка - 12,2 %;

10,7 %; 7,8 %; МЛУ – 11,0 %; 13,3 %; 11,1 %, соответственно), обладающих иммунологической и адаптогенной активностью. Выраженное увеличение в экстрактах на основе ВМИС количественного содержания участвующих в иммунном ответе гидрофильных аминокислот (в экстракте тимуса – до 22 %, селезенки – до 15 %, МЛУ – до 8 %) свидетельствует о положительном влиянии пониженного содержания дейтерия в процессе экстракции.

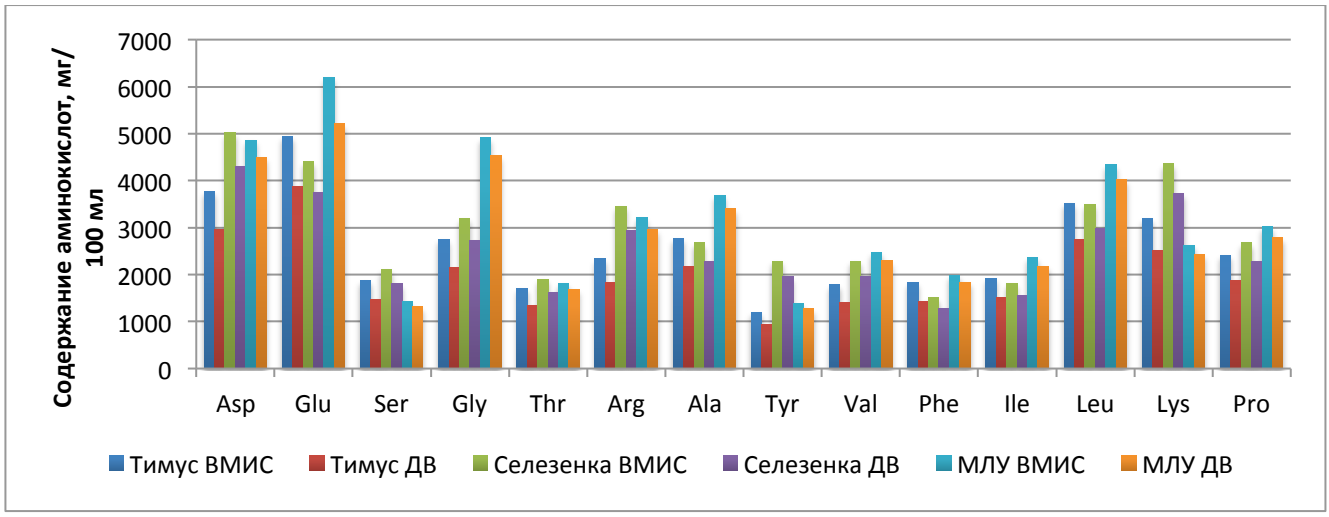


Рисунок 3 –Аминокислотный состав экстрактов иммунных органов свиньи (ВМИС и ДВ)

Электрофоретическое исследование показало (Рис.4), что в состав экстрактов входят вещества с диапазоном молекулярных масс от 10 до 250 кДа.

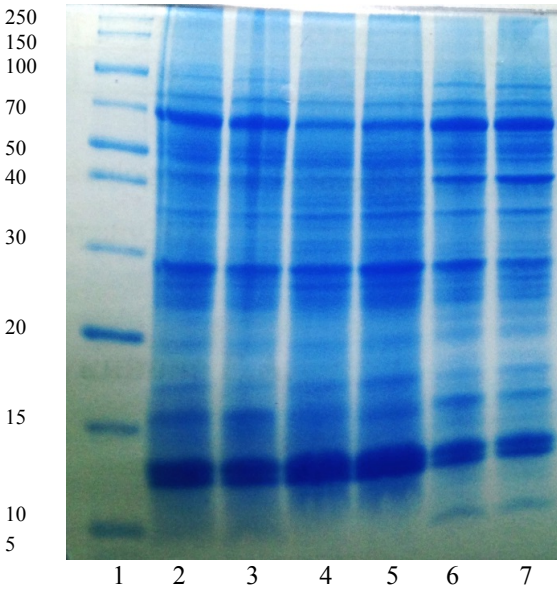


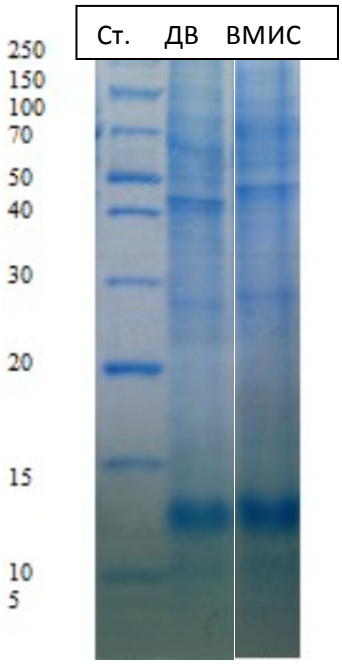
Рисунок 4 – Одномерный SDS-электрофорез в 12,5% ПААГ.
Условные обозначения:
1. Стандарт молекулярной массы (130 кДа – 10 кДа)
2. Экстракт тимуса (ДВ)
3. Экстракт тимуса (ВМИС)
4. Экстракт МЛУ (ДВ)
5. Экстракт МЛУ (ВМИС)
6. Экстракт селезенки (ДВ)
7. Экстракт селезенки (ВМИС)

Отмечены качественные отличия экстрактов на основе ВМИС относительно экстрактов на основе ДВ: у экстракта тимуса обнаружены 7 дополнительных минорных полос в области от 30 до 45 кДа и 3 полосы в диапазоне от 5 до 10 кДа;

селезенки – 2 дополнительные полосы в области от 12 до 15 кДа и 4 полосы в области от 5 до 30 кДа; МЛУ – 4 полосы в области от 10 до 18 кДа, а также широкая белковая зона в области 18-20 кДа и расширение зоны в области менее 5 кДа.

Предположительно низкомолекулярная фракция экстракта тимуса на основе ВМИС может содержать Тимозин бета-10, активирующий ранозаживление и обладающий защитным действием (4,9 кДа); аннексин А1 (38,8 кДа), участвующий во врожденном иммунном ответе как регулятор воспалительного процесса: экстракт селезенки – антиген главного комплекса гистосовместимости-1 (12,7 кДа), бета-2-микроглобулин (13,4 кДа), участвующий в презентации пептидных антигенов в иммунной системе, лизоцим С-1 (14,7 кДа), проявляющий антибактериальные свойства; МЛУ – набор интерлейкинов: IL-2 (15,2 кДа), IL-15 (18,4 кДа), IL-6 (21,1 кДа), IL 23 подгруппы 19 (21,13 к Да), непосредственно вовлеченных в иммунные реакции организма.

Для дальнейших исследований проводили смешивание индивидуальных экстрактов в соотношении 1:1:1. Результаты исследования комплексных экстрактов (Рис. 5) показали сохранность основных соединений, способных к регуляции иммунного ответа в организме.



Белок	Мм, кДа
Complement component C7	93,062
B cell surface marker CD19	62,531
Stimulator of interferon genes protein	41,881
Monocyte differentiation antigen CD14	39,724
Annexin A1	38,759
Interleukin-12 subunit beta	36,829
Myeloid differentiation primary response protein	33,254
MyD88	33,254
Lymphotoxin beta	26,251
IL-6	23,882
Interleukin-18	22,026
Interferon alpha 1	21,330
Interleukin 6	21,097
Interleukin-7	20,161
Interleukin-10	19,934
Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor	16,254
Interleukin 2	15,221

Рисунок 5 - Одномерный электрофорез экстрактов на основе ВМИС и ДВ

Для подтверждения наличия иммунорегуляторных соединений был проведен анализ белкового профиля комплексных экстрактов методом

двумерного электрофореза (Рис. 6). Идентифицированы следующие соединения: трансферрины, влияющие на кроветворение и играющие большую роль при делении клеток; ингибитор диссоциации Rho ГТФазы, участвующий в активации кислорода супероксид-генерирующей НАДФ-оксидазы фагоцитов; глютатион S-трансферраза, являющаяся одним из важнейших средств защиты от токсинов; серпин B9, контролирующий процессы коагуляции и воспаления; определен ряд белков, участвующих в метаболизме (глицеральдегид-3-фосфат-дегидрогеназа, цистатин-Б малатдегидрогеназа, альдолаза).

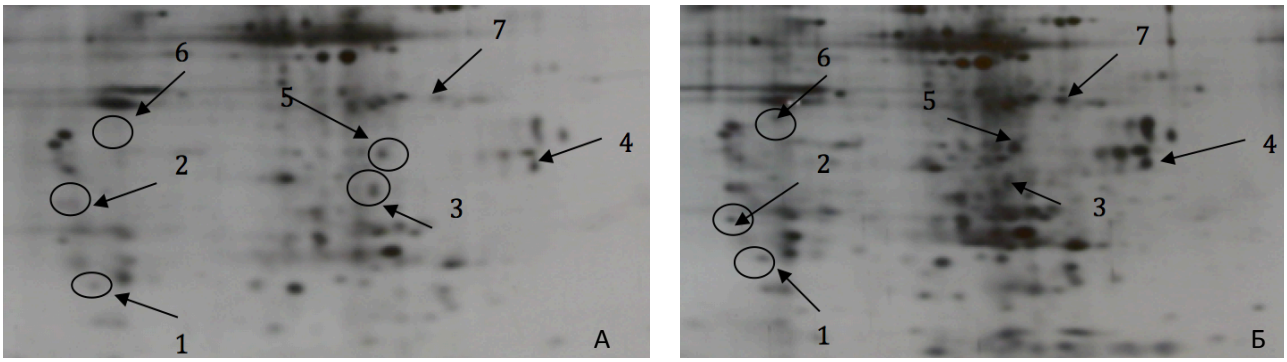


Рисунок 6 - Результаты протеомного анализа комплексных экстрактов на основе ДВ (А) и ВМИС (Б). Условные обозначения: 1 - Интерферон бета протеин; 2 - Гамма-интерферон-индуцируемая-лизосомальная тиол-редуктаза (IFI30); 3 - Миелоидный дифференцирующий белок первичного иммунного ответа (MYD88); 4 - Интерлейкин-12 субъединица бета (IL12B); 5 - Аннексин А1 (ANXA1); 6 - Антиген главного комплекса гистосовместимости 1 класса (SLA-2); 7 - Хемокин-подобный рецептор 1 (CMLKR1)

Таким образом, показано наличие активных биомолекул в выбранном сырье, а также определена их сохранность при выбранных режимах получения комплексного экстракта. Установлено, что низкое содержание дейтерия в экстрагенте увеличивает интенсивность выхода биомолекул. Выявлено наличие активных соединений с молекулярной массой менее 30 кДа. Для увеличения активности биоактивных веществ в экстракте ВМИС была проведена работа по удалению балластных высокомолекулярных веществ и концентрированию целевых тканеспецифичных белков с молекулярными массами менее 30 кДа и более 30 кДа методом ступенчатой ультрафильтрации.

Исследование биологической активности in vitro (Рис. 7) показало, что экстракт на основе ВМИС увеличивает сохранность биологической мембраны эритроцитов, замедляя процесс гемолиза до 30 секунд. Фракция менее 30 кДа обладает мембранотропной активностью в большей степени, чем комплексный экстракт, уменьшая скорость гемолиза до 60 секунд относительно контроля.

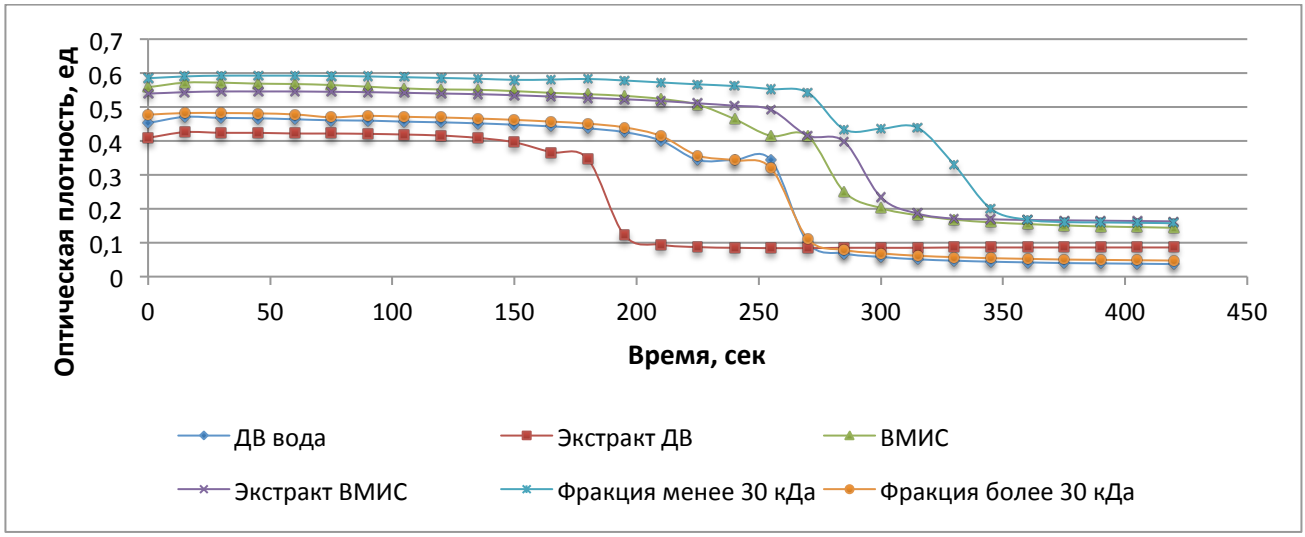


Рисунок 7 - Биологический эффект исследуемых образцов при кислотном гемолизе эритроцитов (концентрация белка в экстрактах 500 нг/мл)

При исследовании ex vivo комплексного экстракта ВМИС выявлена выраженная пролиферация клеток интимы аорты (на 16,6 %); слизистой оболочки желудка (на 13,4%), тимуса (на 21,9 %); печени (на 19,2 %) (Рис. 8). Более выраженная активность показана у фракции экстракта Мм менее 30 кДа: индекс площади составил 24,3 % для интимы аорты, 14,2 % для слизистой оболочки желудка, 26,8 % для тимуса, 21,1 % для печени, что превышало показатели комплексного экстракта на 17 %, 13 %, 22 % и 19 %, соответственно. Фракция более 30 кДа проявила исключительно ингибирующее действие.

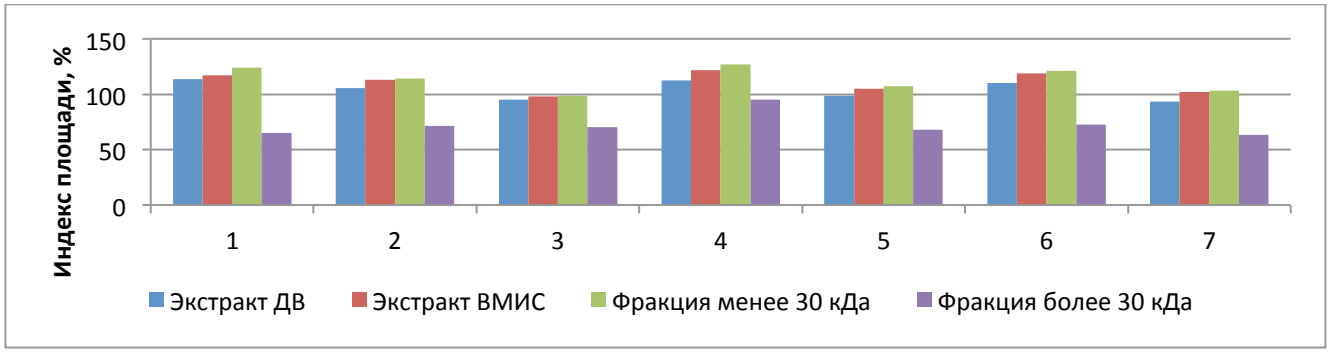


Рисунок 8 - Индекс площади роста эксплантатов при добавлении исследуемых образцов. Условные обозначения: 1-аорта; 2-слизистая оболочка желудка; 3-двенадцатиперстная кишка; 4-тимус;5-селезенка; 6-печень; 7-спинной мозг

На основе полученных данных был сделан вывод, что ВМИС потенциально обладает способностью активировать более полное высвобождение биомолекул из животного сырья. Наибольший потенциал для дальнейших исследований имеет экстракт ВМИС и его фракция менее 30 кДа, что подтверждается положительными результатами исследований in vitro и ex vivo.

Дальнейшие исследования были направлены на выявление биологических свойств комплексного экстракта и его фракций на модели иммунодефицита *in vivo*. Относительно крыс с ИД группы 1 выявлено увеличение содержания лимфоцитов и моноцитов: в группе 3 (экстракт ВМИС) на 18 % и 27 %, в группе 4 (фракция менее 30 кДа) на 22 % и 31 %, в группе 5 (фракция более 30 кДа) до 5%; при этом содержание гранулоцитов уменьшалось (более чем на 20 % - у крыс групп 3 и 4; до 7 % - группы 5). Показано увеличение содержания клеток CD4: для групп 3 и 4 на 40 %, группы 5 на 4 %. При анализе иммуноферментных показателей (Таблица 1) у крыс групп 3 и 4 выявлено увеличение содержания IgG на 5 % и 16 %, IgM – на 8 % и 24 %, Il-2 и Il-6 – до 10 % относительно группы 1, соответственно. У крыс группы 3 по сравнению с группой 2 наблюдалось увеличение содержания КК C1q до 10% и КК C4 до 13%, при уменьшении КК C5 до 6 % и C3 до 4%; у крыс группы 4 – увеличение содержания КК C1q и КК C4 до 10 % и 13 %, при уменьшении содержания КК C5 до 6 % и C3 до 4 %. Анализируемые показатели крыс группы 5 достоверно не отличались от значений группы 1.

Таблица 1. Результаты иммуноферментного анализа крови лабораторных животных по завершении исследования

Показатели	1 группа	2 группа	3 группа	4 группа	5 группа
Il-2, пг/мл	281,14±9,39*	355,87±11,89	309,25±7,42**	310,01±4,63**	278,33±5,60
Il-6, пг/мл	29,94±1,75*	34,89±2,04	32,96±1,50**	32,82±1,11**	29,64±1,34
IgG, мкг/мл	0,479±0,080*	0,532±0,022	0,529±0,016**	0,570±0,018	0,494±0,013
IgM, нг/мл	0,188±0,011*	0,237±0,022	0,225±0,002**	0,248±0,013**	0,140±0,011
C1q, нг/мл	1,88±0,07*	2,54±0,10	2,08±0,05**	2,08±0,03**	1,86±0,04
C3, нг/мл	16,64±1,96	17,07±2,01	17,24±1,91	16,04±1,82	16,48±2,20
C4, нг/мл	149,81±8,34	187,26±10,42	169,88±6,67**	169,88±4,27**	151,30±5,17
C5, нг/мл	17,20±1,78*	18,18±1,62	17,77±1,47	16,22±1,34	17,37±1,62

* - достоверное отличие от интактных крыс 2 группы (P<0,05).

** - достоверное отличие от контрольных крыс 1 группы (P<0,05).

Установлено, что фракция комплексного экстракта менее 30 кДа обладала выраженной биологической активностью как на клеточном уровне, так и на организменном уровне, характеризующейся восстановлением функциональности лейкоцитов крови, увеличением выработки цитокинов, в т.ч. интерлейкинов 2 и 4, ответственных за формирование адаптивного иммунного ответа, а также активацией каскада комплементарного звена.

Таким образом, фракция комплексного экстракта с молекулярной массой менее 30 кДа была выбрана для разработки технологии кормовой добавки.

На основании исследований был сформирован комплекс методов оценки БАВ, включащий исследования мембранотропной активности in vitro, определения органотропности ex vivo и оценки иммуностимулирующей активности in vivo.

В главе 4 описана технология кормовой добавки (Рис. 9), согласно которой была выработана опытная партия. Основные технологические этапы включали: **подготовку сырья** - селезенку, тимус, МЛУ очищают от сопутствующих тканей, измельчают до размера 5х5 см, замораживают при минус 40 °С в течение 24 часов, размораживают при минус (4 – 5) °С, измельчают с использованием мясорубки (100 отверстий, сечение 3 мм); **экстракцию** 0,9 % раствором натрия хлорида (гидромодуль 1:5) на основе ВМИС (D/H=40 ppm) при скорости перемешивания 400 об/мин, в течение 75 мин для селезенки и МЛУ, 30 мин – для тимуса, при скорости перемешивания 300- об/мин - 3 мин; **центрифугирование** для отделения нерастворимого осадка в течение 5 мин при 12000об/мин; **смешивание** экстрактов в соотношении 1:1:1; **фракционирование** с использованием мембраны 30 кДа под давлением 2,5 бар; **получение готовой формы** путем добавления консерванта бензоата натрия – не более 0,2 %. Готовую кормовую добавку разливают в стеклянные бутыли по ОСТ 6-09-108-85 из темного или бесцветного стекла с использованием стерилизующего мембранного фильтра.

Подробное изложение технологии кормовой добавки включено в полный текст диссертационной работы.

Полученная кормовая добавка предназначена для повышения сохранности поголовья свиней, в том числе поросят-отъемышей, за счет укрепления иммунного статуса, повышения адаптогенного потенциала продуктивных животных, увеличения интенсивности роста животных и улучшению качества мясной продукции. Кормовая добавка содержит: белка – не менее 2,0 %, консерванта (бензоат натрия) – не более 0,2 %, поваренной соли – не более 2,0 %, влаги – не более 95,8 %. Представляет собой прозрачную жидкость без цвета, без

запаха. Кормовую добавку хранят в замороженном виде при температуре минус (20±0,5)°С. Срок годности – 6 месяцев.

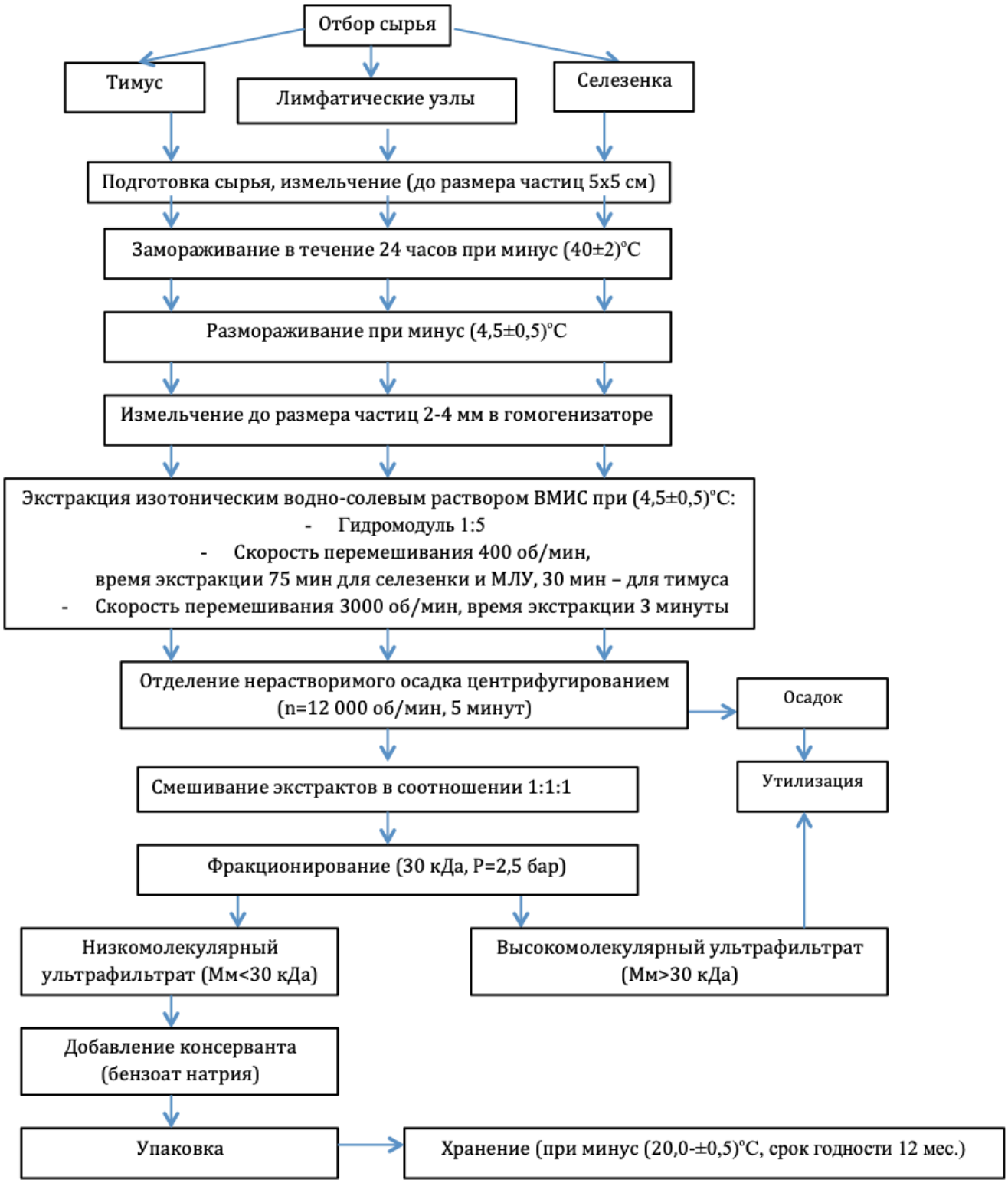


Рисунок 9 - Технологическая схема получения кормовой добавки

Показатели качества и безопасности соответствуют «Единым санитарно-эпидемиологическим и гигиеническим требованиям к товарам, подлежащим

санитарно-эпидемиологическому надзору (контролю)» в течение всего срока годности. Сравнительный анализ в исследованиях in vitro подтвердил сохранение биологических свойств в готовой форме относительно фракции экстракта менее 30 кДа. Кормовая добавка достоверно увеличивала пролиферацию клеток сосудистой стенки (на 24,4 %); энтероцитов (на 15,5%), тимоцитов (на 28,1 %); гепатоцитов (на 21,1 %); повышала резистентность мембраны эритроцита на 65 секунд относительно контроля. Исследования in vivo показали, что использование кормовой добавки повышает содержание CD3 на 24 % и CD4 на 40 %, IgG на 16 % и IgM на 10 %, Il-2 и Il-6 до 10 %, КК C1q до 10% и C4 до 13%, что подтверждает сохранение активности функциональных компонентов. Полученные данные коррелируют с данными, полученными при изучении фракции менее 30 кДа комплексного экстракта на основе ВМИС.

Для определения острой токсичности кормовой добавки были изучены предельно допустимые дозы – 5000 и 2000 мг/кг. Установлено отсутствие признаков интоксикации у лабораторных животных в исследовании безопасности, что позволяет отнести кормовую добавку к IV классу опасности согласно ГОСТ 12.1.007. Также показано отсутствие местно-раздражающего и аллергического действия.

Таким образом, разработанная кормовая добавка малотоксична и низкоаллергенна, обладает высокой биодоступностью и тканеспецифичностью, стимулирует выработку основных антител и цитокинов, регулирует адаптивную систему защиты организма, что способствует увеличению активности неспецифического иммунитета.

Себестоимость производства кормовой добавки на основе биологически активных веществ животного происхождения составляет 350,0 руб на 500 мл.

ВЫВОДЫ

1. Установлены основные технологические параметры выделения целевых белковых соединений из иммунных органов свиньи: экстракция 0,9 % раствором натрия хлорида на основе воды с пониженным содержанием дейтерия (D/H=40 ppm) при гидромодуле 1:5, скорости 400 об/мин, в течение 75 минут, затем при скорости 3000 об/мин 3 минуты, отделение осадка центрифугированием в течение

5 минут со скоростью 12 000 об/мин, смешивание индивидуальных экстрактов в соотношении 1:1:1. Установлено, что использование воды с пониженным содержанием дейтерия увеличивает выход белка на 20 % для селезенки, на 38 % для тимуса и на 35 % для мезентеральных лимфатических узлов.

2. В результате биоинформатического анализа двумерных электрофореграмм идентифицированы целевые биоактивные вещества: альфа-тимозин (MW 4,9 кДа), гликопротеин CD59 (MW 13,79 кДа), интерферон бета протеин (MW 21,9 кДа), гамма-интерферон индуцируемая лизосомальная тиол-редуктаза (MW 27,5 кДа), миелоидный дифференцирующий белок первичного иммунного ответа (MW 33,7 кДа); тирозинкиназа связывающий белок (MW 11,61 кДа).

3. На основании исследований мембранотропной активности in vitro на модели кислотного гемолиза, определения органотропности ex vivo на эксплантатах тканей крыс и оценки иммуностимулирующей активности in vivo на лабораторных крысах с моделью иммунодефицита выявлено, что наибольшей биологической активностью и тканеспецифичностью обладает фракция комплексного экстракта с Мм менее 30 кДа. Разработан комплекс методов оценки биологических свойств кормовой добавки на основе БАВ, заключающийся в последовательном изучении мембранотропной активности in vitro на модели кислотного гемолиза, определении органотропности ex vivo на эксплантатах тканей крыс и оценке иммуностимулирующей активности in vivo на лабораторных крысах с моделью иммунодефицита.

4. Разработана технология кормовой добавки для повышения сохранности поголовья свиней, в том числе поросят-отъемышей, за счет укрепления иммунного статуса, повышения адаптогенного потенциала продуктивных животных, увеличения интенсивности роста животных и улучшению качества мясной продукции, обладающей малотоксичным (5 класс согласно ГОСТ 32644) и низкоаллергенным действием. Определена себестоимость производства кормовой добавки, которая составила 350,0 руб на 500 мл.

По материалам диссертации опубликованы следующие работы:

Научные статьи в журналах, индексируемых в БД Web of Science и Scopus

1. **Vasilevskaya E.R.** Proteomic study of pig's spleen/ E.R. Vasilevskaya, A.G. Akhremko// Potravinarstvo slovak journal of food sciences . – 2019. – Vol.13, №1. – P. 314-317. ***(Scopus)***
2. Fedulova L.V. Influence of Deuterium Depleted Water on Rat Physiology: Reproductive Function, Forming and Posterity Development/ L. V. Fedulova, S.S. Dzhimak, E. A. Kotenkova, **E. R. Vasilevsky**, I.M. Chernukha // Jornal of Pharmacy and Nutritional Sciences. – 2016.- №6 -P.55-60. ***(Scopus)***
3. Fedulova L.V. Influence of Different Polypeptides Fractions Derived from Sus Scrofa Immune Organs on the Rats Immunological Reactivity/ L.V. Fedulova, **E.R. Vasilevskaya**, E.A. Kotenkova, A.A. Elkina, M.G. Baryshev, A.B. Lisitsyn //Journal of Pharmacy and Nutrition Sciences. - 2017. - Vol. 7. - №2. - P. 35-40. ***(Scopus)***
4. Fedulova L.V. Identification of tissue-specific proteins of immunocompetent organs of Sus scrofa isolated in deuterium depleted medium/ L. Fedulova, A. Elkina, **E. Vasilevskaya**, E. Barysheva// Medical Science. – 2018. – V. 22, Issue 94. – P. 509-513. ***(Web of Science)***
5. Chernukha I.M. Comparative study of biocorrective protein-peptide agent to improve quality and safety of livestock products / I.M. Chernukha, L.V. Fedulova, **E.R. Vasilevskaya**, E.A. Kotenkova // Potravinarstvo Slovak Journal of Food Sciences. – 2017. - V.11. - №.1. - P. 539-543. ***(Scopus)***

Научные статьи в журналах, рекомендованных ВАК РФ

6. Ахремко А.Г. Применение протеомных технологий для изучения тимуса, селезенки и мезентеральных лимфатических узлов свиней/ А.Г. Ахремко, Л.В.Федулова, **Е.Р. Василевская**// Все о мясе. – 2019. – №1. – С. 54-57.
7. Чернуха И.М. Изучение влияния воды с модифицированным изотопным (d/h) составом на репродуктивную функцию, формирование и развитие потомства крыс/ И.М. Чернуха, Л.В. Федулова, Е.А. Котенкова, **Е.Р.Василевская**, А.Б. Лисицын // Вопросы питания. - 2016. - Т. 85. № 5.- С. 36-43.
8. Чернуха И.М. Выделение природных иммуномодуляторов из тканей Sus Scrofa с использованием воды с модифицированным изотопным составом/ И.М.

Чернуха, Л.В. Федулова, **Е.Р. Василевская**, Е.А. Котенкова, С.С. Джимак// Вопросы питания. - 2016. - Т. 85. - № S2. - С. 248.

9. **Василевская Е.Р**. Влияние изотопного состава воды на экстракцию биоактивных соединений/ Е.Р. Василевская, Л.В. Федулова, Е.А. Котенкова // Все о мясе. - 2016. - № 6. - С. 42-45.

10. Чернуха И.М. Биотрансформация побочного мясного сырья как инновационный подход к созданию протеомно-пептидных средств направленного действия/ И.М. Чернуха, Л.А. Люблинская, Л.В. Федулова, **Е.Р. Василевская**, Е.А. Котенкова, А.Н. Макаренко//Все о мясе. -2015. - № 2.- С. 14-17.

11. Лисицын А.Б. Изучение in vivo природного иммуномодулирующего средства «Динормин»/ А.Б. Лисицын, Л.А. Люблинская, Л.В. Федулова, **Е.Р. Василевская**, И.М. Чернуха, А.Н. Макаренко// Все о мясе. - 2015. - № 3. - С. 14-17.

12. Чернуха И.М. Соединения антимикробного действия в слизистых оболочках животных/ И.М. Чернуха, Л.В. Федулова, **Е.Р. Василевская**, Е.А. Ертикеева, А.Г. Ахремко //Все о мясе. - 2015. - № 5. - С. 32-35.

13. Федулова Л.В. Исследования in vivo, in vitro, ex vivo: оценка заявленных свойств и изучение токсичности как неотъемлемые этапы создания продуктов здорового питания/ Л.В. Федулова, Е.А. Котенкова, **Е.Р. Василевская**, Э.Б. Арашанова // Все о мясе. - 2015. - № 6. - С. 32.

14. Чернуха И.М. Изучение природы действующего вещества препарата «Динормин» для профилактики и лечения иммунодефицитных состояний поросят/ И.М. Чернуха, Л.А. Люблинская, Л.В. Федулова, **Е.Р. Василевская**, А.Н. Макаренко, Е.А. Тимохина // Все о мясе.-2015.-№ 6. - С. 36.

Другие публикации и материалы конференций

15. Федулова Л.В.. Перспективные источники природных стимуляторов иммунитета / Л.В. Федулова, **Е.Р. Василевская** // Мясные технологии. - 2016. - № 12. - С. 37-39.

16. Василевская Е.Р. Тканеспецифичные биомолекулы - стимуляторы репарационной регенерации иммунных компонентов крови / **Е.Р. Василевская**, Л.В. Федулова // Гены & клетки. - 2017.- Т. XII. - №3. - С. 58.

17. **Василевская Е.Р**. Методология исследования белково-пептидных компонентов экстрактов тканей Sus Scrofa/ Е.Р. Василевская, Е.А. Котенкова, Е.А.

Лукинова, Е.А. Калинова // Теория и практика переработки мяса. - 2017. -Т. 2. № 3. - С. 79-85.

18. **Василевская Е.Р**. Животное сырье как источник природных регуляторов иммунитета/ Е.Р. Василевская, Л.В. Федулова// Актуальная биотехнология. - 2015. - № 3 (14). - С. 97-98.

19. Федулова Л.В. Алгоритм оценки in vitro продуктов питания, содержащих биологически активные вещества/ Л.В.Федулова, **Е.Р. Василевская**, Е.А. Котенкова, Е.А. Калинова// Все о мясе. - 2018. - № 6.- С. 47-49.

20. **Василевская Е.Р.** Комплексная оценка биологически активных веществ животного происхождения, обладающих иммунотропной активностью// Все о мясе. –2018. - №3. – С.32-35.

21. Vasilevskaya E.R.The study of tissue-specific proteins and peptides influence on innate immunity/ **E.R. Vasilevskaya**, E. A. Kotenkova, L. V. Fedulova // J Clin Cell Immunol. – 2016.- V. 7:3.– P.86.

22. Kotenkova E. A.. Natural tissue-specific proteins and peptides stimulate innate immunity in experimental immunodeficiency / E. A. Kotenkova, L. V. Fedulova, **E.R. Vasilevskaya** // J Clin Cell Immunol. – 2016.- V. 7:3(Suppl). – P.79.

23. Chernukha I.M. Influence of autolysis on tissue-specific proteins in Sus scrofa heart and aorta/ I.M. Chernukha, L.V. Fedulova, E.A. Kotenkova, **E.R. Vasilevskaya**, S.S. Shishkin, L.I. Kovalyov // Sborník přednášek a posterů 19. a 20. října 2016, Konferenci «Hygiena a technologie potravin XLVI. Lenfeldovy a Höklovy dny» - P.171-174.

24. Dzhimak S.S. Animal tissue-specific biomolecules influence on rats with cyclophosphamide-induced immunosuppression // S.S. Dzhimak, **E.R. Vasilevskaya** // 8th European Immunology Conference, Madrid, Spain 29 June - 1 July 2017. - J Clin Cell Immunol. – 2017. - 8:3(Suppl). - P. 44.