ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ НАУЧНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ «ФЕДЕРАЛЬНЫЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР ПИЩЕВЫХ СИСТЕМ ИМЕНИ В.М. ГОРБАТОВА» РАН

На правах рукописи

ВАСИЛЕВСКАЯ ЕКАТЕРИНА РОМАНОВНА

«Разработка кормовой добавки на основе биологически активных веществ из сырья животного происхождения»

Специальность:
05.18.04 – технология мясных, молочных и рыбных продуктов
и холодильных производств

Диссертация на соискание ученой степени

кандидата технических наук

Научный руководитель: кандидат технических наук, Федулова Лилия Вячеславовна

Москва – 2019

ОГЛАВЛЕНИЕ

Введение……...4

Глава 1 Обзор научно-технической литературы……..... 10

1.1 Влияние иммунного статуса сельскохозяйственных животных на качество животноводческой продукции…… 10

1.2 Обзор биологически активных веществ, повышающих иммунный статус сельскохозяйственных животных…….. 15

1.3 Теоретическое обоснование технологии биологически активных веществ иммуномодулирующего действия из сырья животного происхождения…….. 20

1.4 Заключение по обзору научно-технической литературы…….. 30

Глава 2. Организация эксперимента, объекты и методы исследования ….. 32

2.1. Объекты исследования …… 32

2.2 Организация эксперимента …… 32

2.3 Методы исследований ……..…… 35

Глава 3. Результаты исследования . …… 43

3.1 Обоснование технологических параметров получения биологически активных веществ ……..……..… 43

3.1.1 Алгоритм выделения биологически активных веществ……. 43

3.1.3 Результаты изучения аминокислотного состава и белкового профиля экстрактов……..……..… 46

3.1.4 Модификация технологической схемы выделения БАВ и результаты исследования полученных БАВ……..…. 54

3.2. Результаты биологических экспериментов по изучению эффективности и безопасности БАВ ……..…… 69

3.2.1 Результаты исследования БАВ in vitro……. 69

3.2.2 Результаты исследования БАВ in vivo……. 71

Глава 4 Технологическая часть ……..……..…… 75

4.1 Характеристика сырья и ингредиентов, используемых для производства кормовой добавки ……..…… 75

4.2 Технология производства кормовой добавки…… 76

4.3 Результаты испытаний безопасности и биологических свойств кормовой добавки ……..…… 80
4.4 Характеристика конечной продукции производства …… 86
4.5 Расчет себестоимости производства кормовой добавки …… 87
Заключение ……..…… 91
Список использованной литературы …….. 92

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность работы. Ежегодное увеличение поголовья продуктивных животных приводит к ухудшению экологической и эпизоотической обстановки в развитых и развивающихся странах, поскольку они увеличивают риск трофической передачи инфекционных и паразитарных заболеваний. В Европейском союзе ежегодно сообщают более чем о 320 000 случаях зоонозных заболеваний, однако реальное число значительно выше.

Основные профилактические меры, направленные на снижение риска заражения продуктивных животных инфекционными заболеваниями, помимо улучшения условий содержания и рациона кормления, включают в себя вакцинацию и применение антимикробных препаратов, в том числе кормовых. При этом ненадлежащее использование антибиотических средств в животноводстве является основным фактором возникновения и распространения антибиотикрезистентных патогенов, мутационная изменчивость и рост вирулентности которых приводит к увеличению риска развития зоонозов [Chattopadhyay M.K., 2014; Ardolino M., 2014; Done H.Y., 2015; Thevenot P.T., 2014; Sun Z., 2017]. Помимо этого, нерациональное использование антибиотиков негативно сказывается как на самих животных – приводит к увеличению восприимчивости молодняка к инфекциям и замедлению темпов роста, возникновению дисбиозов, снижению прироста живой массы, так и на качестве животноводческой продукции – увеличивается процент мяса с пороками, снижается содержание эссенциальных нутриентов, нарушается баланс аминокислот и жирных кислот [D. Pighin, 2016; H. Hao et al., 2014]. Кроме того, серьезной проблемой является рост антибиотикорезистентности у потребителей мяса от таких животных. По этой причине в странах Европейского союза с 2006 года запрещено использование кормовых антибиотиков, взамен применяются натуральные кормовые добавки, например – фитобиотики. Одним из путей снижения заболеваемости, повышения продуктивности и качества животноводческой продукции является укрепление общего неспецифического иммунобиологического статуса сельскохозяйственных животных посредством

применения биоактивных веществ животного происхождения [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 публикаций о стимуляторах неспецифического иммунитета природного происхождения, в том числе адаптогенах, преимущественно растительных, и пептидах, выделенных из животных клеток и тканей. Иммуномодулирующие препараты эндогенного (физиологического, или биологического) происхождения представлены, преимущественно, монопрепаратами – иммунорегуляторными пептидами и цитокинами, выделенными из центральных (тимус и костный мозг) и периферических органов (селезенка) иммунитета молодняка или эмбрионов свиней и крупного рогатого скота. Сегодня на рынке представлены три поколения иммуномодулирующих пептидов тимуса и костного мозга. К первому поколению относятся препараты на основе экстрактов, содержащие нативные гормональные полипептиды с молекулярной массой от 1 до 5 кДа: «Тактивин» (Биомед, Россия), «Тималин» (Цитомед, Россия), «Тимоптин» (ГНИИСКЛС, МЭЗ, Россия), «Тимостимулин» (ТР-1, Италия), «Тимактид» (МЭЗ, Россия), «Вилозен» (Биофарма, Украина), «Тимусамин» (Клиника института биорегуляции и геронтологии, Россия). Препараты 2-го и 3-го поколений представляют собой искусственно синтезированные аналоги природных гормонов тимуса, таких как α-тимозин и тимопоэтин или фрагментов этих гормонов, обладающих биологической активностью. Однако подобные продукты направленного иммуномодулирующего действия для сельскохозяйственных животных не разработаны. 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 солюбилизирующего агента при получении биоактивных компонентов из природного сырья. Современные технологии позволяют получать воду с различным изотопным составом. Имеются данные, косвенно указывающие на зависимость скорости протекания реакций в 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.

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

В рамках поставленной цели решались следующие основные **задачи:**

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 себестоимость 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 и обоснованы контрольные точки для процессов экстракции, очистки и фракционирования биологически активных веществ из иммунных органов свиньи.

Методология и методы исследования

В данной работе использованы методы выделения и фракционирования биологически активных веществ (экстракция и ультрафильтрация), физико-химические (электрофоретические и масс-спектрометрические) методы для анализа биологически активных веществ и их идентификации; биологические методы, включая in vitro, ex vivo и in vivo методы, с целью оценки биологических свойств, безопасности и стабильности 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 А1 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).

Глава 1 Обзор научно-технической литературы

1.1 Влияние иммунного статуса сельскохозяйственных животных на качество животноводческой продукции

Укрепление неспецифического иммунобиологического статуса сельскохозяйственных животных является наиболее эффективным способом снижения общей заболеваемости, в том числе патологиями, общими для человека и животных [Caspar Y. et al., 2017; Zhang X. et al., 2014]. За счет укрепления здоровья животных, соответственно, улучшается и качество получаемой продукции – уменьшается процент сырья с наличием пороков качества, влияющих на цвет, структуру и вкус мяса, сохраняется баланс аминокислотного соотношения и эссенциальных нутриентов, уменьшается процент жира, что делает продукцию более полезной для конечного потребителя [Średnicka-Tober D et al., 2016]. Помимо уменьшения экономических потерь вследствие падежа животных или зачистки очагов заболеваний, высокий статус здоровья животных способствует их ускоренному росту без использования дополнительных средств, а также улучшает репродуктивные функции [Arshad M.S.et al., 2018].

Большинство новых заболеваний, появившихся у людей в последние десятилетия, характеризуются природной очаговостью либо синантропностью и передаются человеку от позвоночных животных. Распространение таких болезней – зоонозов – происходит ежедневно по всему миру, путем контактирования с дикими или домашними животными (больными или носителями), потребления недоброкачественной пищевой продукции и прочее [Nelson M. I. , A. L. Vincent, 2015]. Зоонозы представляют собой широкий спектр заболеваний и варьируются от эндемичных, среди которых наиболее значимы бруцеллез, сибирская язва, туберкулез крупного рогатого скота, бешенство; паразитарные заболевания – гидратация, эхинококкоз, трихинеллез, к эмерджентным (чрезвычайным) зоонозам – высокопатогенный птичий грипп, болезнь Нипаха/Хендра и губчатая энцефалопатия крупного рогатого скота [Lerma L.L. et al., 2014].

Значимость большинства природно-очаговых инфекций определяется степенью тяжести клинического течения и процента летальных случаев (в

среднем от 3 до 35%, однако при бешестве этот процент может достигать 100%), и, как результат, увеличенные денежные затраты на лечение и проведение противоэпидемических мероприятий [Davis G. S. et al., 2015; Sun Z. et al., 2017; Osman K. et al., 2017].

Так, несвоевременное или некачественное проведение профилактических и противоэпизоотических мероприятий может привести к большому экономическому ущербу от инфекционных болезней, который складывается в основном из потерь от падежа и депопуляции животных, утилизации трупов и отходов; от снижения продуктивности животных вследствие их заболевания; от недополучения приплода из-за бесплодия животных; от утраты племенной ценности животных; из-за выбраковки количества и качества продукции и сырья; а также вледствие затрат на проведение специальных ветеринарных мероприятий.

Стоит отметить, что в Российской Федерации эпидемиологическая и эпизоотологическая статистика по распространению зоонозных заболеваний остается напряженной. В общем за 2017 год на территории нашей страны превышен эпидемический порог по трансграничным (АЧС) и социально значимым болезням (бруцеллез, лептоспироз, бешенство, туберкулез) до 23 %, относительно 2016 года [Россельхознадзор, 2018]. Помимо этого, в отношении свиней на 29 декабря 2017 г. были зафиксированы такие вирусные и бактериальные заболевания, как классическая чума свиней, сибирская язва, болезнь Ауески, ящур. Всего с 2007 г. по III кв. 2017-го в России выявлено 1232 очагов АЧС, в том числе 91 (12%) — на коммерческом предприятии и 471 (38%) — в дикой фауне. Так, убытки только от АЧС со времени ее первой регистрации (с 2007 года) на территории России составили более 75 млрд руб от простоя предприятий, помимо этого было уничтожено более 800 тысяч свиней.

В соответствии с данными Всемирной организации охраны здоровья животных [World Organisation for Animal Health, 2019] за последние два года во всем мире количество сообщений о возникновении очагов особо опасных болезней животных имеет тенденцию к росту, так, в 2017 году было зафиксировано более 7770 случаев.

Одним из значимых факторов данной неблагополучной тенденции является возникновение новых патогенов, их распространение как среди животных, так и перекрестный перенос с животных на людей в глобальном масштабе. Таким образом, здоровье животных тесно связано со здоровьем людей и благополучием окружающей среды [Davis G. S. et al., 2015, Pighin D. et al., 2016; Messele Y. E. et al., 2017].

Обеспечение безопасного питания имеет первостепенное значение для защиты здоровья человека и повышения качества жизни. Безопасное питание играет важную роль, будь то на внутреннем производстве и потреблении, ввозится или экспортируется. Кроме того, производство безопасных пищевых продуктов представляет собой возможность получения доходов и доступа к рынкам. В течение последних десятилетий подход пищевой цепи был признан важным шагом вперед для обеспечения безопасности пищевых продуктов от производства до потребления. Такой подход требует приверженности всех игроков пищевой цепи, включая производителей, торговцев, переработчиков, дистрибьюторов, компетентных органов, а также потребителей [Egger-Danner C. et al., 2016; Klein G. et al., 1998; Langdon A. et al., 2016; Nhung N. T. et al., 2018].

При этом, Международная продовольственная и сельскохозяйственная организация ООН (Food and Agriculture Organization, ФАО) в качестве основного аспекта устойчивого производства животноводческой продукции рассматривает здоровье животных [Fouad A.M. et al., 2016; Mora L. et al., 2018]. Данная продукция не только представляет собой источник дохода для агропредприятий и фермеров в развивающихся странах, поскольку роль животноводства в ВВП сельского хозяйства значительна во многих развивающихся странах, но и является основой рациона большинства людей [Bastin C. et al., 2016; Egger-Danner C. et al., 2016].

Комплексный подход ФАО – под названием «Единое Здоровье» - уделяет внимание агроэкологической устойчивости, защите биоразнообразия, эффективному использованию природных ресурсов и безопасности сетей снабжения продовольствием, особенно в районах, наиболее пострадавших от

нищеты и болезней животных [Bastin C. et al., 2016; Economou V., Gousia P., 2015; Fouad A.M. et al., 2016]. Важное значение при борьбе с распространением патогенов в данной программе имеет раннее обнаружение заболеваний, ускорение времени оповещения ветеринарных служб и быстрые ответные действия [Economou V., Gousia P., 2015; Langdon A. et al., 2016]. На сегодняшний день в Европе реализована целая серия программ по охране здоровья животных, связанных с созданием новейшей практики в области профилактики и борьбы с первичными заболеваниями, которые угрожают животноводству, здравоохранению и торговле, проекты в области охраны здоровья животных и распространение практической информации, такие как Центр управления чрезвычайными ситуациями по здоровью животных [Shousha A. et al., 2015; Nhung N. T. et al., 2018].

Для защиты потребителей от зоонозных заболеваний, ЕС принял комплексный подход к безопасности пищевых продуктов от фермы до тарелки. Подход включает в себя оценку риска (например, сбор данных, анализ, рекомендации) и управление рисками (например, законодательные меры, целевые показатели для сокращения) [Schmidt J. W. et al., 2015; Pulendran B. et al., 2015].

Ообенности противодействия заболеваниям, общим для человека и животных, в силу современных социально-экономических условий, в значительной степени связаны с интенсификацией производства животноводческой продукции, которая достигается за счет международных и межконтинентальных перевозок сельскохозяйственных животных, увеличение их поголовья, внедрение новых видов кормовых продуктов, модификацию режимов содержания и ухода за животными [Vossenkuhl B. et al., 2014; Done H. Y. et al., 2015; Meek R. W. et al., 2015]. В результате возникают определенные препятствия при проведении мероприятий государственного ветеринарного и санитарно-эпидемиологического надзора. Исключительная стойкость и периодическое возрастание активности патогенов обусловливают циклические резкие увеличения процента заболеваемости. Постоянно происходит расширение масштабов и увеличение интенсивности освоения зон с активно действующими

природными очагами заболеваний, что впоследствии приводит к их широкому распространению среди населения [Bastin C. et al., 2016; Jassim S. A. A. et al., 2014; Rahimi E. et al., 2014]. Усиленные режимы биозащиты и охраны здоровья животных в целом предотвращают проблемы инфекционных заболеваний, но иногда происходят крупные вспышки, когда патоген совершает скачок вирулентности, избегает использованной вакцины, приобретает устойчивость к антибиотикам или путешествует по пищевой цепи [Messele Y. E. et al., 2017; Gupta N. et al., 2018; Smith R. A. et al., 2017].

1.2 Обзор биологически активных веществ, повышающих иммунный статус сельскохозяйственных животных

Традиционно для обеспечения здоровья животных и качества животноводческой продукции в ветеринарии используют биологические и химико-фармацевтические ветеринарные препараты в качестве превентивных и терапевтических средств [Manyi-Loh C et al, 2018].

Вакцинация необходима для создания иммунологической резистентности животных к наиболее распространенным заболеваниям для предотвращения распространения инфекций от больных животных [Sandbulte M.R. et al., 2015]. Подобные препараты созданы исключительно для иммунизации, и не обладают лечебным действием, кроме того, вакцинировать можно только здоровых животных. Помимо этого, необходимость соблюдения строгого графика вакцинации и возможность проявления у животного нежелательных побочных симптомов (например, аллергических), снижает эффективность данных превентивных мер [Quinn K.M. et al., 2015].

Для лечения животных, а также в качестве профилактики широко используются антибиотики. Данная группа препаратов обладает активностью против обширного спектра патогенов бактериальной природы, а также способствуют увеличению привесов у молодняка, что привело к использованию антибиотических средств как кормовых добавок [Chattopadhyay M.K., 2014]. Еще в прошлом веке, при использовании антибиотиков в ветеринарных целях, стало известно, что они способствуют ускорению роста и развития животных, положительно влияя на набор их массы и увеличивая коэффициент использования кормов. С тех пор в широкую практику вошел новый ряд кормовых добавок для сельскохозяйственных животных, включающий в свой состав антибиотические препараты в различных дозах. Сегодня большинство подобных добавок в Европе и мире запрещены, допускаются только незначительные дозы антибиотиков немедицинского назначения в составе премиксов, белково-витаминных добавок и комбикормов [Smith R. A. et al., 2017].

Несмотря на большое количество существующих антибиотических средств препаратов, большинство из них не универсальны и не могут справиться со всеми возможными заболеваниями, а также не способны их предотвратить. Кроме того, в последние годы выявлены риски применения антибиотиков в животноводстве. Так, вследствие частого и неконтролируемого применения подобных препаратов в терапевтических и профилактических целях и повышенной мутационной изменчивости патогенных бактерий, происходит увеличение их вирулентности и интенсивности проявления заболеваний, что создает селективное давление, способствующее отбору, выживанию и размножению резистентных штаммов микроорганизмов.

Доказано, что антибиотики являются катализаторами генетической трансформации условно патогенных бактерий в вирулентные формы, их широкое применение приводит к усилению факторов патогенности у многих микроорганизмов кишечника (Escherichia, Salmonella, Enterococcus, Proteus, Klebsiella, Campylobacter, Staphylococcus) [McEachran A.D. et al., 2015]. В целом, учитывая ассоциированный характер инфекций, для их нивелирования требуется использование все более сложных композиций и поиск новых, более эффективных антибиотиков [Netea M. G. et al., 2017; 4], что приводит к увеличению экономических затрат. В связи с этим использование антибиотиков должно четко регулироваться и не превышать допустимые нормы. Сегодня в соответствии с действующими нормативными документами – ТР ТС 034/2013 О безопасности мяса и мясной продукции – строго регламентируется количество некоторых антибиотиков в продукции животноводства, часть из которых вообще запрещаются даже в следовых количествах.

На современных предприятиях для повышения здоровья животных широко используются кормовые добавки различных типов – минеральные, витаминные, протеиновые добавки и биостимуляторы [Duan J. et al., 2014]. Особенно ценны в этом качестве кормовые добавки с биологически активными свойствами (например, гуминовые кислоты), которые не только восполняют рацион животных по недостающим элементам питания, но и служат активаторами

обменных процессов, оказывая комплексное положительное влияние на весь организм [Crooks L, Guo Y., 2017; Soler C. et al., 2018]. В качестве витаминных кормовых добавок активно применяются сенная мука, богатая каротином, хвоя, рыбий жир (известный высоким содержанием витаминов А и В3), облучаемые кормовые дрожжи (в которых много витамина D2), растворы концентратов витаминов на масляной основе и холина, витаминов группы В и других жирорастворимых витаминов, а также водные витаминные растворы и сухие стабилизированные препараты (например, витамина А). Используются и более специфические кормовые добавки, в частности, сырые фосфатиды, восполняющие дефицит холина в организме животных [Argüello H. et al., 2018; Cottingim K.M. et al., 2017; Liao S.F. et al., 2017; Weaver A.C.et al., 2013].

Поиск природных веществ адаптогенного действия синтетической и нативной природы обусловлен их низкой токсичностью и реактивностью инкорпорирования в общий метаболизм. Среди них наиболее изучены препараты растительного и синтетического происхождения, не обладающие видовой специфичностью и не способные комплексно воздействовать на организм как живую систему в целом [Burny W. et al., 2017; Hirano H., 1982]. На настоящий момент появляется все больше публикаций о стимуляторах неспецифического иммунитета природного происхождения, в том числе адаптогенах, преимущественно растительного происхождения, и пептидах, выделенных из животных клеток и тканей [Salehi B. et al., 2018]. Стоит отметить, что исследования Европейского и Азиатского (преимущественно Индия и Китай) научных сообществ направлены на изучение механизмов действия растительных адаптагенов [Bagheri G. et al., 2016]. Однако отечественная наука больше внимания уделяет тонкому органическому синтезу, в том числе содержащему пласт разработки по адаптогенам синтетической природы, а также животным биомолекулам, в частности антимикробным дефензимам [Bastani P. et al., 2016].

В области растительного сырья уже найден подход к разработке целевых белковых молекул: идентификация активного начала и разработка на основе полученных субстанций монопрепаратов [Kalantari H. et al., 2017]. Однако для

характеристики активных компонентов из сырья животного происхождения к настоящему моменту подобный алгоритм не создан. Адаптогены растительного происхождения оказывают комплексное иммуностимулирующее действие за счет прямого влияния на экспрессию соответствующих белков-участников системы гуморального иммунитета и активиризирующих системы защиты организма на гормональном и протеомном уровнях [Levy O. et al., 2014, Sundareswaran L. et al., 2017]. Кроме того, адаптагены способны существенно снижать степень оксидативного стресса и увеличивать общую выносливость и резистентность организма [Teow S.Y. et al., 2018]. Механизм действия адаптогенов связан с их активирующим влиянием на обменные процессы, при этом, большая часть стимулируют процессы окислительного фосфорилирования, нормализуют показатели энергетического и нуклеинового обмена [Li Y. et al.,2017; Thakur M. et al., 2007], повышают активность факторов антиоксидантной защиты и угнетают пероксидное окисление липидов [Xiang L.et al., 2018]. Препараты проявляют мембрано-защитное действие; большинство адаптогенов обладают антигипоксической активностью. Кроме того, ряд препаратов обладает активностью на гормоны, стимулируют биосинтез катехоламинов, ингибируют выработку кортикостерона и простагландинов [Ruwali P. et al., 2018].

Кроме того, различные адаптогены дифференцированно (наиболее выражено у препаратов эхинацеи, родиолы розовой, огуречной травы) оказывают иммунотропное влияние, за счет увеличения общего числа иммунокомпетентных клеток и синтеза общих антител к основным медиаторам стресс-реализующей и стресс-лимитирующей системы, регуляции Т-клеточного ответа [Rehman S.U. et al., 2016].

На основе изученных природных соединений были синтезированы синтетические адаптогены – актопротекторы – применяемые, в основном, для улучшения физической работоспособности, условно разделяют на 3 группы в соответствии с химической структурой [Oliynyk S. et al., 2013; Shishavan, N.G. et al., 2017]. Производные бензимидозола (бемитил, этомерсол и пр.), легковсасываемые препараты антиастенического действия, не вызывающие

психомоторного возбуждения. Установлен сложный механизм действия, включающим активизацию генома клетки, оптимизацию митохондриального окисления, снижение окислительного стресса (нормализация СОД, каталазы, ферменты синтеза глутатиона) и стимуляцию клеточного иммунного ответа (увеличение экспрессии белков иммунной системы) [Choi K.T., 2008; Ambrogini E. et al., 2017; Melo-Gonzalez F. et al., 2017].

Производные адамантана (адамантилбромфениламин, хлодантан, адемол); также обладают антиастеническим действием, повышая устойчивость к перегреву. Механизм действия этой группы актопротекторов основан на способности повышать активность нижних отделов центральной нервной системы через дофаминергическую систему, не оказывая выраженное действие на норадренергические медиаторы [Al-Wahaibi L. H. et al., 2017]. Адамантилбромфениламин обладает выраженной иммунной активностью – повышает уровень В-клеток и циркулирующих иммунных комплексов в крови.

Соединения, принадлежащие другим химическим классам (производные тиазолоиндола, 3-гидроксипиридина, никотиновой кислоты, 1-оксо-4-азо-2-силацикланы и пр.) принадлежат к 3-ей группе актопротекторов. Большинство производных тиазолоиндолов и 3-гидроксипиримидина обладают выраженной антигипоксической активностью [Shaik, J. S. et al., 2013].

Гораздо меньше изучены иммуностимуляторы животного происхождения. Использование органов различных видов животных в медицинских целях имеет давнюю традицию. Основателем органотерапии считается французский физиолог Шарль Эдуард Браун-Секар, проводивший эксперименты с экстрактами различных органов. Также разработаны такие органопрепараты, как спермин и оповарин, органопрепарат «Promonta», симпатомиметин [Заико М.В. и др., 2014]. Однако в ветеринарной практике подобные препараты не получили широкого применения.

1.3 Теоретическое обоснование технологии биологически активных веществ иммуномодулирующего действия из сырья животного происхождения

Одним из перспективных направлений современной ветеринарии и биотехнологии является выделение и производство биологически активных субстанций из природного сырья, в том числе животного. Лекарственное сырьё животного происхождения делится на лекарственных животных (медицинские пиявки); сырье животного происхождения (панты); продукты животного происхождения [Хаитов Р.М., Пинегин Б.В., 2000]. Классификация препаратов животного происхождения по технологии производства представлена на Рис. 1. Помимо этого, возможна технологическая классификация на препараты высушенных тканей (желез); экстракты тканей (желез) для внутреннего применения; высокоочищенные препараты для инъекций.

Рис. 1. Классификация препаратов животного происхождения по технологии производства.

На сегодняшний день принято считать, что органопрепараты могут действовать согласно нескольким механизмам. Одной из основных особенностей является эффект гомологичности – фармакологическая точность действия

активных соединений на функции конкретного гомологичного органа или ткани. Происходит это по причине повышенной тропности биомолекулярных соединений, выделенных из животного органа, к гомологичным тканям человека или животного: происходит накопление (кумуляция) активных соединений и, соответственно, происходят фармакологические эффекты в тех органах (тканях), из которых выделены соединения. Г. Блобел, биохимик из США и лауреат Нобелевской премии, создал теорию механизма органотропизма, как всеобъемлющего свойства живого. Так, гомологичность активных соединений не зависит от метода и места введения органотерапевтической субстанции, более того – в продолжение происходит также трансфер иных других лекарственных средств в гомологичный орган, если оба препарата вводить одновременно. В результате данной теории была разработана липосомальная технология, основанная на помещении биомолекул в липосомы, которые способны проникать через гистогематические барьеры [Q-H Wang D. et al., 2014].

Одним из характерных свойств органопрепаратов является эффект восполнения. Особенно значительно данный эффект способен проявляться при высоких концентрациях активных соединений, которые стремятся восполнить дефицит биомолекул, а также уничтожают на биохимическом уровне дефекты клеток. Данный эффект является основным при дальнейшем развитии физиологических регенеративных реакций.

Биомолекулярные препараты способны оптимизировать регенеративные процессы в гомологичных органах благодаря свой органотропности и эффекту восполнения, что приводит к нивелированию воспалительных процессов, исчезновению очагов пролиферации патологических клеток, стимуляции эффектов антидегенерации, снижению роста опухолей, замедлению процессов старения и атрофии [Souto W.M.S. et al., 2018].

Например, было показано, что гормон эпифиза мелатонин оказывает стабилизирующее действие на патологически измененные колебания любых физиологических функций, защищает мозг и внутренние периферические ткани от эмоциональных дисорганизаций и оксидативного стресса [Raposo B. et al.,

2018] Недавние исследования альфа-2-макроглобулин (α2M), неселективного ингибитора различных типов неспецифических протеаз и переносчика цитокинов, факторов роста и гормонов, выявили его радиозащитный эффект [77].

В ходе исследований механизмов, лежащих в основе защитных реакций организма на патоген, был открыт новый класс природных антибиотиков, продуцируемых животными и накапливающихся в тканях – катионные антимикробные пептиды. На сегодняшний день известно несколько сотен антимикробных пептидов [Котенкова Е.А. et al., 2018], среди которых выделяют несколько структурных классов, механизм действия для которых общий и основан на нарушении нормальной проницаемости мембран клеток патогенных организмов [Baradaran M. et al., 2017]. Из нейтрофилов и тканей эпителиального происхождения сегодня выделяют CAMP - дефензины, протегрины, кателицидины и другое, которые обладают широким спектром действия, оказывая антимикробное, антивирусное, антипротозойное и антигрибковое действия и противоопухолевое действие, при этом, вероятность появления резистентности патогенных микроорганизмов минимальна [Kotenkova E.A. et al., 2017]. Помимо этого, катионные линейные пептиды были выделены из лейкоцитов некоторых рыб (например, русского осетра), доказанно обладающие антимикробной активностью. Кроме того, в молочной железе коров обнаружено высокое содержание транскриптов кателицидина и бета-дефенсина (МРНК DEFB1, BNBD4, BNBD5, BNBD10).

В настоящее время разработаны и проходят клинические испытания препараты на основе антимикробных пептидов: производные индолицидина – MBI-226 и MX-594AN (Vancouver, British Columbia, Canada) для лечения катетер-ассоциированных инфекций и акне; пептид hLF1-11 с N-конца человеческого лактоферрина (AM- Pharma Holding, Netherlands) для лечения бактериальных инфекций и остеомиелита. Синтетический аналог маганина - пептида, полученного от африканской лягушки, пексиганан используется для лечения диабетических язв стопы, гистатин для лечения кандидоза ротовой полости. Интермедин (Intermedinum) и его синтетические аналоги, оказывающие

адаптогенное и метаболическое действие, улучшающие адаптацию к темноте, повышающие остроту зрения, считаются эндогенными кардиопротекторами. Получены пептиды вилон, тимоген (Цитомед МГМБ НПК), кристаген (НПЦ РиЗ) и R -1, обладающие разными иммунопротекторными свойствами.

В середине прошлого века был открыт новый класс биоактивных соединений – пептидные биорегуляторы, способствующие восстановлению специфических функций тех органов и тканей [Lori A. et al., 2017].

Эндогенные пептидные биорегуляторы, получаемые из органов и тканей сельскохозяйственных животных и их эмбрионов, принимают активное участие в поддержании структурного гомеостаза и функционирования клеточных популяций, которые содержат и продуцируют данные активные факторы. Данные препараты - цитомедины – способны контролировать как экспрессию генов, так и синтез белка, что препятствует развитию структурных и функциональных изменений, повышают устойчивость иммунной системы к дестабилизирующим факторам внешней и внутренней среды. Ранее в Институте биорегуляции и геронтологии СЗО РАМН создано шесть лекарственных препаратов: природные - тималин, эпиталамин, простатилен, кортексин, ретиналамин, и синтетический препарат тимоген. Кроме того, был создан ряд биологически активных добавок – цитогенов и цитомаксов. Цитомаксы представляют собой низкомолекулярные фракции природных пептидов с установленной структурой, выделенные из различных органов и тканей животных, сосудов, почек, печени, глаз, и многих других. Другой сходный по функциональным особенностям класс природных биологически активных добавок к пище – цитогены, которые содержат только один вид молекул, являющийся «активным центром» препарата, наиболее значимый укороченный пептид, синтезированный из природных аминокислот. В результате данных особенностей, цитогены обладают более быстрым действием на организм, однако после завершения терапевтического курса эффект быстро исчезает, в то время как эффект от цитомаксов сохраняется в течение долгого времени.

Известно, что тимус, селезенка и мезентеральные лимфатические узлы

потенциально содержат большой спектр активных биомолекул и различных факторов, которые обладают потенциалом органного тропизма и могут кумулироваться в гомологичных органах (активные соединения тимуса - в тимусе, селезёнки - в селезёнке и т.п.), активируя процессы клеточной и внутриклеточной регенерации [Eberl G. et al., 2017]. Подробнее роль данных органов представлена на рисунке 2.

Рисунок 2 – Роль иммунных органов в формировании иммуных реакций.

По мнению многих, селезёнка - это резервуар, депо крови, благодаря особому строению кровеносных сосудов содержащий значительный объем крови, которая в случае необходимости выбрасывается в системный кровоток, и это имеет очень большое значение для развития приспособительных реакций организма в экстремальных условиях. При этом, в ткани органа действительно накапливаются форменные элементы крови — эритроциты, лейкоциты, тромбоциты, 30-50% и более от общего количества циркулирующих в крови. Одновременно с этим, селезенка продуцирует лимфоциты и моноциты, а также отдельные иммунные факторы, способствующие выявлению и нейтрализации антигенов и очищению

крови от различных патогенных бактерий и вирусов. В селезенке разрушаются эндотоксины, нерастворимые компоненты клеточного детрита при ожоговых, травматических и других повреждениях тканей [Werz O. et al., 2018; Cronkite D.A. et al., 2018; Jain A. et al., 2017].

В селезенке разливают две основные зоны - красную и белую пульпу. Белая пульпа представляет собой совокупность лимфоидной ткани, образующей В- и Т-зависимыми зонами, представляющими собой лимфатические узелки и лимфатические периартериальные влагалища, соотвественно [Ascough S. et al., 2018]. Основная функция белой пульпы заключается в синтезе специфических антител, факторов гуморального иммунитета –иммуноглобулинов и т.д.

Основными структурными компонентами красной пульпы являются ретикулярная ткань, содержащая малодифференцированные и фагоцитирующие клетки крови, и кровеносные сосуды синусоидного типа. В красной пульпе селезенки происходит удаление отживших и поврежденных эритроцитов. Макрофаги селезенки реутилизируют железо из разрушенных эритроцитов, превращая его в трансферрин. Помимо этого, селезенка участвует в обмене белков, активно синтезируя молекулы альбуминов, глобина (основного белкового компонента гемоглобина) [Kell A. et al., 2015; Maazi H. et al., 2017].

Тимус является центральным органом лимфоидного кроветворения и иммунной защиты организма. В этом органе происходит антигеннезависимая дифференцировка костномозговых предшественников Т-лимфоцитов в специфические иммунокомпетентные клетки (Т-лимфоциты). Зрелые лимфоидные клетки осуществляют реакции клеточного иммунитета, активно участвуют в регуляции гуморального иммунитета, что реализуется в периферических органах кроветворения и иммунной защиты. В экстрактах тимуса обнаружено свыше 20 биологически активных веществ, в том числе дистантного действия, условно позволяющих отнести тимус и к железам эндокринной или иммуноэндокринной системы. Размеры тимуса максимальны при рождении, но в процессе полового созревания организма тимус подвергается значительной атрофии в результате процесса инволюции. Уменьшение размеров тимуса

наблюдается и при старении организма, с чем отчасти связывают понижение иммунитета у старых животных [Romo M.R. et al., 2016; Crosby C.M. et al., 2018; Novoseletskaya A.V. et al., 2015].

Лимфатические узлы являются периферическими органами иммунной системы, выполняющими функции биологических фильтров, лимфоцитопоэза и образования антител. Эти образования располагаются по ходу лимфатических сосудов, и, как правило, в рыхлой волокнистой соединительной ткани рядом с крупными кровеносными сосудами. Узлы, расположенные в областях стенок полостей, называют пристеночными (париетальными), а расположенные около внутренних органов — висцеральными. Мезентеральные лимфатические узлы, то есть «брыжеечные», локализуются в брыжейке. Данная соединительнотканная структура соединяет петли тонкого и толстого кишечника с лимфатической системой и региональными лимфатическими узлами. Барьерная функция лимфатических узлов при воспалении проявляется в замедлении лимфооттока и создании оптимальных условий для развития реакций фагоцитоза, накопления гуморальных факторов и лимфоцитов, максимальной активации их и макрофагов. Известно, что активация лимфоцитов в лимфоидной ткани кишечника может привести к развитию системных иммунных реакций за счет миграции активированных факторов [Novoseletskaya A.V et al., 2015; Chen D. et al., 2019, Gudyrev O. et al., 2018; Farahmand M. et al., 2016].

Таким образом, иммуные органы продуктивных животных представляют собой неисчерпаемый ресурс биологически активных соединений, обладающих иммуномодулирующим эффектом.

Сегодня разработаны препараты эндогенного происхождения, представленные, преимущественно, монопрепаратами – иммунорегуляторными пептидами и цитокинами, выделенными из центральных (тимус и костный мозг) и периферических органов (селезенка) иммунитета преимущественно молодняка или эмбрионов свиней и крупного рогатого скота (КРС) молодых животных или эмбрионов. Так, разработаны и представлены на рынке три поколения иммунорегуляторных пептидов тимуса и костного мозга. К иммуномодуляторам

первого поколения, традиционно, относят препараты на основе экстрактов, содержащие нативные гормональные полипептиды с молекулярной массой от 1 до 5 кДа: «Тактивин» (Биомед, Россия), «Тималин» (Цитомед, Россия), «Тимоптин» (ГНИИСКЛС, МЭЗ, Россия), «Тимостимулин» (ТР-1, Италия), «Тимактид» (МЭЗ, Россия), «Вилозен» (Биофарма, Украина), «Тимусамин» (Клиника института биорегуляции и геронтологии, Россия) и др [Кузнецова Д.П. и др., 2015; Chernukha I.M. et al., 2016]. Данные препараты направлены на нормализацию и повышение функциональной активности Т-системы иммунитета и гемопоэза, усилению клеточных иммунных реакций и антителогенеза, свертывающей и антисвертывающей системы, нейроэндокринной регуляции, репаративной регенерации тканей. Среди положительных свойств полипептидов тимуса отмечают высокую избирательность действия, эффективность в малых дозах, отсутствие отрицательных побочных эффектов и быстрое выведение из организма. Синтетические аналоги гормонов тимуса или их фрагментов относят к иммуномодуляторам тимического происхождения второго и третьего поколения («Иммунофан» (Бионокс, Россия), «Тимоген», или «Оглюфанид» (Цитомед, Россия), «Рефнот» (Рефнот-Фарм, Россия). Содержание в селезенке огромного количества тимусзависимых, тимуснезависимых и макрофагальных иммунных факторов, таких как неспецифический сывороточный тетрапептид тафтсин, находящийся в составе Fd-фрагмента IgG, активизирующий функциональные свойства макрофагов и полиморфно-ядерных лейкоцитов, компоненты комплемента – С3- и С4-фрагменты (например, С3b), фактор Р и пр., послужило созданию широкого спектра препаратов на основе биологически активных веществ селезенки эмбрионов и молодняка КРС [Lafarga T. et al., 2014]. Например, «Polyerga» (Merck, Великобритания), содержащий олигопептиды; «Диасплен» (Диалек, Беларусь) – депротеинизированный дериват; «Спленин» и «Спленопид» (Фармак, Украина) и биологически активная добавка «Пептидный комплекс 1» (Eni-sala, Россия) – пептидные комплексы. Данные препараты повышают содержание Т-лимфоцитов в периферической циркуляции и их функциональную активность, стимулируют продукцию СТФ, и в дальнейшем

приводят к нормализации процессов свободно-радикального перекисного окисления липидов, а также способствуют интенсификации репаративных и трофических процессов.

Сегодня с применением современного оборудования стало возможным выделение регуляторных компонентов цитоплазмы клетки, называемых цитоиндукторами, к которым относят факторы роста, дифференцировки, различные биорегуляторы, белки, кейлоны, цитамины, пептиды, предшественники синтеза гормонов, медиаторы и прочее [Garrett R. H. et al., 2013; Салова Т.Ю. и др., 2016]. Согласно литературным данным, технология получения биологически активных веществ (БАВ) из органов и тканей животных основана на первичном измельчении сырья, дальнейшей его экстракции, в процессе которой происходит получение биологически активных веществ, для удаления балластных соединений применяется центрифугирование, ультрафильтрацию для разделения и концентрирования активных фракций и удаления балластных веществ, сушка для удаления влаги из экстракта [Котенкова Е.А., 2014; Кашинова Э.Б., 2016]. В связи с повышенной чувствительностью белков и пептидных соединений отбор и измельчение тканей животных проводят при пониженной температуре (не более 4°С), избегая замораживание [Whitford D., 2013]. При экстракции широко применяются разнообразные буферные смеси с повышенными или пониженными значениями pH среды (фосфатные, цитратные, боратные), в качестве растворителей применяют органические растворители (например, глицерин, сахарозу) и неионные детергенты (такие как, тритон Х-100, додецилсульфат натрия и дезоксихолат натрия) [Лопина О. Д. et al., 2013]. Однако при их применении необходимо учитывать возможные разрывы белково-белковых связей, разрушение четвертичной и третичной структуры белков, что в итоге приводит к снижению биологической активности. Кроме того, необходимо учитывать содержание в конечном экстракте примесей посторонних веществ, которые невозможно удалить из системы путем сушки или нейтрализовать при сохранении его биологической активности [Уилсон К., 2015; Хисматуллина З. Н., 2013]. В связи с чем, отдается предпочтение солевой или слабокислой экстракции.

Однако экстракция с пониженной кислотностью приводит к понижению pH в сторону изоэлектрической точки. Кроме того, при изменении pH в более кислую сторону происходит активация ряда протеолитических ферментов, что приводит к деструкции целевых белков [Martínez-Maqueda D., 2013], что можно обратить внесением в раствор солей, но это, в свою очередь может приводить к наличию в конечном экстракте нежелательных ионов.

Таким образом, разработка подходов к технологии иммуномодулирующих средств животного происхождения является весьма актуальной, поскольку данная группа веществ весьма малочисленна, несмотря на свою высокую эффективность, что обусловлено мировой тенденцией к производству синтетических аналогов.

1.4 Заключение по обзору научно-технической литературы

Таким образом, на сегодняшний день существует большое количество синтетических и натуральных ветеринарных средств и кормовых добавок, используемых для лечения и профилактики болезней продуктивных животных. Однако они не обладают видовой специфичностью и не способны комплексно воздействовать на организм как живую систему в целом. В последние годы большинство исследований направлены на поиск природных веществ адаптогенного и иммуномодулирующего действия ввиду их низкой токсичности и реактивности инкорпорирования в общий метаболизм. Существующие технологии выделения БАВ с иммуномодулирующей направленностью из животного сырья основаны на использовании отдельных органов, несущих защитную функцию. Данный подход является корректным, поскольку основные иммунные органы являются потенциальными источниками активных молекул, оказывающих значительное влияние на регуляторные процессы в организме, стимулируя выработку антител, факторов иммунитета и других соединений, вовленных в каскад защитных реакций организма. Однако в каждом иммунном органе содержатся в основном только свойственные ему соединения (например, тимус ответственен за дифференцировку и созревание Т-клеток, а селезенка – В-клеток). Так, для комплексного иммуного ответа и более выраженного адаптационного действия кормовая добавка должна включать в себя основные элементы Т- и В-клеточного иммунитета, а также иные иммунные факторы, которые могут формироваться в организме и накапливаться в лимфатической системе.

Актуальной темой на сегодняшний день остается повышение иммунологической резистенстности продуктивных животных, а также, возможно, улучшить свойства создаваемых кормовых добавок за счет использования в технологии получения видо- и тканеспецифических биологически активных веществ животного происхождения из иммунных органов среды с измененным модифицированным изотопным составом.

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

В рамках поставленной цели решались следующие основные **задачи:**

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

Глава 2 Организация эксперимента, объекты и методы исследования

2.1 Объекты исследования

В соответствии с целью и задачами диссертационной работы объектами исследования являлись:

1) Иммунные органы свиньи – селезенка, тимус, мезентеральные лимфатические узлы;

2) Экстракты селезенки, тимуса, мезентеральных лимфатических узлов (МЛУ);

3) Ультрафильтраты экстрактов селезенки, тимуса, мезентеральных лимфатических узлов с молекулярной массой более 30 кДа и менее 30 кДа;

4) Эксплантаты тканей лабораторных крыс (аорта, слизистая оболочка желудка, двенадцатиперстная кишка, тимус, селезенка, печень, спинной мозг);

5) Лабораторные животные с моделью цитостатик-индуцированного иммунодефицита, их кровь и сыворотка крови.

2.2 Организация эксперимента

Для реализации настоящей диссертационной работы, достижения цели и решения поставленных задач был составлен план проведения экспериментальных исследований, которые проводились в условиях Экспериментальной Клиники-лаборатории биологически активных веществ животного происхождения и других лабораториях ФГБНУ «ФНЦ пищевых систем им. В.М. Горбатова» РАН.

Для проведения исследований проводили отбор иммунных органов свиней – селезенки, тимуса, мезентеральных лимфатических узлов на ОАО Агропромышленном комплексе «Дубинино».

Исследования были проведены поэтапно, согласно схеме исследования, представленной на рисунке 3.

На первом этапе исследования проводился анализ литературы с целью обоснования взаимосвязи качества продукции животноводства и иммуного статуса продуктивных животных, изучения существующих биоактивных средств, направленных на сохранение гомеостаза и повышающих адаптогенный потенциал сельскохозяйственных животных для формирования методологических

принципов и подходов к разработке технологии биологически активных веществ (БАВ) из сырья животного происхождения.

Второй этап заключался в определении химического состава иммунных органов свиньи; подборе технологических параметров экстракции БАВ, включая обоснование выбора солюбилизирующего агента с различным D/H соотношением, посредством изучения степени экстракции и скорости выхода белка, анализа концентрации белка, изучения аминокислотного состава и распределения белковых фракций одномерным электрофорезом индивидуальных экстрактов иммунных орагнов и комплексных экстрактов.

На третьем этапе была проведен протеомный анализ комплексных экстрактов на основе ВМИС и ДВ методом двумерного электрофореза, идентифицированы целевые биологически активные вещества с использованием масс-спектрометрических методов и биоинформатического анализа. На данном этапе было принято решение о включении дополнительной стадии разделения и концентрирования биоактивных веществ для удаления балластных веществ и увеличения активности фракций.

На четвертом этапе проводили исследование биологических свойств комплексного экстракта иммунных органов на основе ВМИС и его фракций с молекулярными массами менее 30 кДа и более 30 кДа, включащее анализ мембранотропной активности методом кислотных эритрограмм in vitro, определения органотропности на эксплантатах тканей крыс ex vivo и оценки стимулирующей активности на компоненты иммунной системы крыс с моделью иммунодефицита in vivo.

Пятый этап включал апробацию технологии кормовой добавки, основанной на использовании в качестве экстрагента воды с пониженным содержанием дейтерия и применении ультрафильтрации как способа фракционирования биологически активных веществ с молекулярной массой менее 30 кДа, оценку показателей безопасности и стабильности, а также исследование биологических свойств готовой формы кормовой добавки и подтверждение сохранности активности биологических функциональных компонентов.

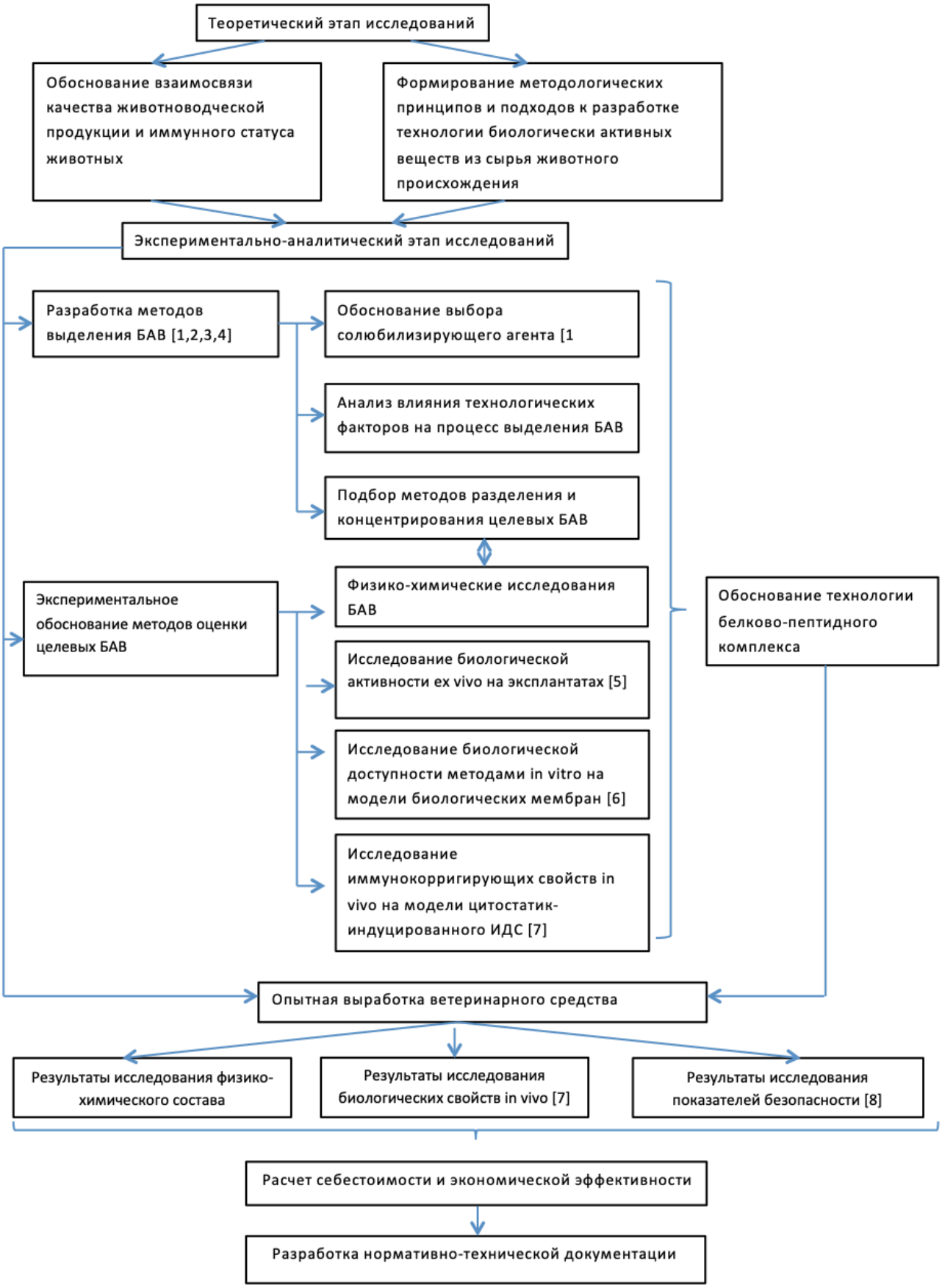


Рисунок 3 – Схема организации исследования

2.3 Методы исследований

В работе использовали стандартные и общепринятые химические, физико-химические, биологические методы исследований, а также методы статистической обработки результатов.

Массовую долю минеральных веществ (золы) определяли в соответствии с [ГОСТ 31727-2012, 2013]; **массовую долю жира** – в соответствии с [ГОСТ 23042-2015, 2016]; **массовую долю белка** – в соответствии с [ГОСТ 25011-2017].

Извлечение целевых биологически активных веществ проводилось в несколько этапов:

- подготовка сырья – исследуемые иммунные органы очищали от сопутствующих тканей, затем измельчали до размера 5х5 см, замораживали при минус 40 °С (Haier, Китай), размораживали при минус (4 – 5) °С, измельчали с использованием мясорубки (100 отверстий, сечение 3 мм);

- экстракцию измельченного сырья проводили с использованием лабораторного оборудования - диспергирующей установки ЛДУ (Лаботекс, Россия) при пониженной температуре (4-5 °С). В качестве экстрагентов использовали 0,9 % раствор соли хлорида натрия в дистилированной воде (ДВ, D/H=150 ppm) и 0,9 % раствор натрия хлорида в воде с пониженным содержанием дейтерия (ВМИС, D/H=40 ppm).

В ходе эксперимента проводили пробоотбор индивидуальных экстрактов с целью определения белковой концентрации. Отбор проб проводился по следующей схеме: в начальной точке (до начала экстракции), каждые 15 мин на протяжении 4 часов, центрифугировали отобранные пробы с использованием центрифуги СМ-6М (ELMI, Латвия) при скорости 3500 об/мин (5 мин) и отбирали супернатант. Белок измеряли в супернатанте.

Метод определения общей концентрации белка – по методу Кингслея-Вейксельбаума биуретовой реакцией [Brady P.N. et al., 2015; Акимова Е.И., 2009] с использованием полуавтоматического анализатора BioChemSA (HTI, США).

Был проведен расчет **основных характеристик** процесса извлечения биологически активных веществ:

– степень экстракции (отношение массы экстрагированного вещества к общей массе вещества в водном растворе):

$$D = \frac{M}{m} * 100\ \% \qquad (1)$$

где M – масса экстрагированного вещества, г;

m – общая масса вещества в водном растворе, г.

– скорость экстракции (изменение концентрации биологически активных веществ во времени):

$$\nu = \frac{\Delta c}{\Delta t} = \frac{dc}{dt} \qquad (2),$$

где c – концентрация белка в экстракте, г/л;

t – время экстракции, мин.

Аминокислотный анализ экстрактов – с использованием анализатора Aracus (PMAGmbH, Германия) методом ионообменной хроматографии по [Сыровая А.О. и др., 2014].

Протеомный профиль экстрактов исследовали методами одномерного и двумерного электрофореза. Одномерный электрофорез проводили в 12,5 % полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия (SDS-PAGE) в камере «VE-10» (Helicon, США) [Xu Y.J.et al., 2009]. Окрашивание проводили Кумасси G-250 и азотнокислым серебром (по методике Blum'a). Двумерный электрофорез проводили по О`Фарреллу с изоэлектрофокусированием в амфолиновом (IEF-PAGE) в гельэлектрофоретической камере «Bio-Rad» (США) [Cordwell S.J. et al., 1995]. Визуализацию белков на двумерных электрофореграммах проводили окрашиванием (реактив Кумасси R-250 и азотнокислое серебро). Для проведения компьютерной денситометрии использовали двумерные электрофореграммы, находившиеся во влажном состоянии. Их полные цифровые изображения и/или изображения отдельных фрагментов получали с помощью сканирования на сканере Epson Expression 1680. Полученные цифровые изображения редактировали в графическом редакторе и обсчитывали количественное содержание белков с помощью пакета программ

ImageMaster 2D Platinum версий 7 («GE Healthcare», Швейцария). При определении количества белка использовалось не менее 3-х электрофореграмм с равным нанесением. Разброс значений оптической плотности составлял не более ±1,5%.

Идентификацию белков осуществляли путем MALDI-TOF MS и MS/MS масс-спектрометрии на времяпролетном масс-спектрометре MALDI Ultraflex (Bruker, Германия) с УФ-лазером (336 нм) в режиме положительных ионов (500–8000 Да), калибровка производилась по известным пикам автолиза трипсина [Hillenkamp F. et al., 1991]. Биоинформатический анализ масс-спектров триптических пептидов проводили с использованием программы Mascot с опцией PeptideFingerprint (MatrixScience, США), точность определения массы MH+ 0.01%, с проведением последующего поиска в базах данных NCBI [Вострикова Н.Л., Чернуха И.М., 2017].

Ультрафильтрацию комплексного экстракта ВМИС проводили с использованием установки Vivaflow 200 (Sartorius, Германия) на полиэфирсульфоновых мембранах (диаметр пор 30 кДа, давление P-2,5 бар).

Исследование биологических свойств *in vitro* смеси экстрактов, фракций и готовой формы определяли методом кислотных эритрограмм (стабильность биологических мембран) по [Цуркан М.В. и др., 2013; Мальчевский В.А. и др., 2013; Лопатина Е. В. и др., 2005; Конки Д. и др., 1989]. Для исследования стабильности биологических мембран брали 20 мкл крови, полученной из хвостовой вены белых крыс-самцов стока Wistar массой 200-220 г, вносили в пробирку с 10 мл 0,9 % раствора NaCl, содержащего разведенный исследуемый образец с концентрацией белка 500 нг/мл для определения минимальной действующей дозы. Инкубацию эритроцитов в растворе проводили в течение 60 минут. Эритроциты того же животного, после инкубации в 0,9 % растворе NaCl на основе дистиллированной воды и на основе ВМИС, являлись контролем. Затем 2 мл эритроцитарной взвеси смешивали с 2 мл 0,004 Н соляной кислоты, разведенной в физиологическом растворе. Затем с помощью фотоэлектрокалориметра КФК-3-01 (ЗОМЗ, Россия) при длине волны 650 нм,

отмечали динамику изменения значений оптической плотности раствора с периодом 15 секунд, до наступления полного гемолиза эритроцитов.

Исследование биологических свойств *in vitro* фракции комплексного экстракта ВМИС менее 30 кДа и готовой формы проводили методом розеткообразования (РО) по [Зарецкая Ю. М., 1983] на тимоцитах, выделенных из тимуса 15-ти морских свиней (m = 240-250 г). Тимус, извлеченный у наркотизированной морской свинки, помещали в среду 199 и гомогенизировали в стеклянном гомогенизаторе. Гомогенат фильтровали и центрифугировали 10 мин при 1500 об/мин, надосадочную жидкость сливали, осадок суспензировали средой 199. Далее в сухую пробирку вносили 3% раствора уксусной кислоты и добавляли взвесь тимоцитов; микроскопировали при помощи камеры Горяева. Полученную суспензию клеток доводили до концентрации 20 х 10^6 клеток/мл средой 199, одновременно готовили суспензию с концентрацией 2 х 10^6 клеток/мл (норма). В центрифужную пробирку вносили в соотношении 6:1 суспензию тимоцитов в концентрации 20 х 10^6 клеток/мл и 0,5% раствор трипсина и слегка смешивали для визуального обнаружения и удаления сгустка. Далее суспензию клеток отмывали от трипсина центрифугированием в течение 10 минут при 1500 об/мин, надосадочную жидкость сливали, к осадку добавляли 3 мл среды 199 и перемешивали. Данную процедуру проводили дважды, после чего к осадку добавляли 1 мл среды 199 и перемешивали. Далее готовили рабочую суспензию в концентрации 2 х 10^6 клеток/мл (контроль). В первую пробирку вносили 0,1 мл суспензии клеток в концентрации 2 х 10^6 клеток/мл (норма), во вторую (контроль) и третью (опыт) центрифужные пробирки вносят по 0,1 мл суспензии тимоцитов, отмытых трипсином в аналогичной концентрации. В третью пробирку добавляли 0,02 мл 0,01% раствора исследуемого образца, приготовленного перед использованием, разведенного в среде 199. Затем во все пробирки добавляли по 0,1 мл 1% суспензии свежих отмытых эритроцитов кролика стерильным раствором 0,9% изотонического натрия хлорид, разведенных в среде 199. Взвесь клеток во всех пробирках перемешивали и центрифугировали при 1000 об/мин в течение 5 мин. После центрифугирования клетки ресуспендировали и

подсчитывали в камере Горяева процентное содержание розеткообразующих клеток (РОК) в каждой из пробирок. За РОК принимали тимоцит, присоединивший 3 и более эритроцитов. Если количество РОК в пробирке с тимоцитами не обработанных трипсином (норма), менее 40% или в опыте менее чем в контроле, результаты исключали из опыта и заменяли другим животным. Далее определяли среднее арифметическое процентное соотношение содержания РОК у 5 животных. Образец считали биологически активным, если при снижении среднеарифметического числа РОК при воздействии трипсина в сравнении с нормой, он восстанавливает РОК не менее чем на 40% по сравнению с контролем.

Исследование биологических свойств *ex vivo* смеси экстрактов, фракций и готовой формы проводили по [Лопатина Е. В., 2005] на фрагментах (эксплантатах) тканей (около 1 мм^3) клинически здоровых крыс-самцов стока Wistar (массой 220 ± 5 г), полученных из ИЦИГ СО РАН: эксплантатах аорты (n = 150), слизистой оболочки фундального отдела желудка (n = 80), двенадцатиперстной кишки (n = 144), тимуса (n = 160), селезенки (n = 144), печени (n = 144) и спинного мозга (СМ) (n = 144). Выделенные эксплантаты помещали в чашки Петри с коллагеновым покрытием (Thermo Fisher Scientific, США), затем их инкубировали 5-7 мин при 37 °С – это необходимо для приклепления эксплантатов органов, далее добавляли в чашку Петри питательную среду с внесёнными исследуемыми объектами в концентрации 100 нг/мл. Состав питетельной среды для эксплантатов тканей: 35 % среды Игла, 35 % раствора Хенкса, 25 % фетальной бычьей сыворотки, 0,6 % глюкозы, 0,5 ед/мл инсулина, 100 ед/мл бензил-пенициллина. Инкубировацию эксплантатов проводили в условиях CO^2 – инкубатора (Lamsystems, Россия) в течение 72 часов при 38,5 °С. В инкубаторе поддерживалась увлажненная атмосфера и концентрация углекислого газа 5 %. Затем через 36 часов после начала инкубации проводили смену питательной среды. Получение эксплантатов и все манипуляции с органами и тканями были проведены в асептических условиях в ламинарном боксе (Lamsystems, Россия). Через 72 часа с помощью фазово-контрастного инвертируемого микроскопа (ЛОМО, Россия) определяли индекс площади (ИП).

Индекс площади представляет собой соотношение общей площади эксплантата, включая периферическую зону роста, к начальной площади эксплантата (центральная зона). Условной единицей площади являлся квадрат окуляра – сетки микроскопа (со стороной квадрата 150 мкм). Индекс площади выражается в процентах, принималось за 100 % значение ИП контрольных эксплантатов, культивируемых в условиях питательной среды.

Для расчетов использовали программу STATISTICA 10. Полученные данные представлены в виде «Среднее значение ± Стандартное отклонение» (M ± m). Статистическую достоверность рассчитывали с применением однопараметрического ANOVA теста с применением критерия Дункана, в качестве значимого уровня выбрана вероятность 0,1.

Исследование биологических свойств *in vivo* комплексного экстракта ВМИС, его фракций с молекулярными массами менее 30 кДа и более 30 кДа, и готовой формы проводили на половозрелых клинически здоровых сексуально наивных крысах-самцах Wistar spf-категории (n=50) средней массой (400 ± 20 г; разброс по группе ±8 г), полученных из ЦГР ИЦиГ СО РАН (Новосибирск). Крыс содержали в системе индивидуально-вентилируемых клеток (в составе вентиляционного блока VENT II и стеллажа с клетками типа Bio.A.S. тип III (EHRET, Германия)) при оптимальном микроклимате в каждой отдельной клетке (температура (22±3)°C), влажность ((50-60)%), освещение 12/12. После адаптации в течение 20 суток части животным (n=40) воспроизводили модель иммунодефицитного состояния (ИДС), оставшаяся часть животных (n=10) без воздействия (интактные; 5 группа). Воспроизведение ИДС осуществляли по [Cheng D. et al., 2017] путем трехкратного (каждые 72 часа) внутрибрюшинного введения «Циклофосфамида» (Sigma, США) в дозе 100 мг/кг веса. Динамику развития иммуносупрессии оценивали по окончании моделирования (на 12 сутки) путем оценки параметров периферической крови, взятой из хвостовой вены.

Для исследования комплексного экстракта ВМИС и его фракций с молекулярными массами менее 30 кДа и более 30 кДа животные были распределены на группы:

1 – контрольные животные с моделью ИД;

2 – интактные животные;

3 – животные с моделью ИД, которым вводили экстракт ВМИС;

4 – животные с моделью ИД, которым вводили фракцию комплексного экстракта ВМИС с молекулярной массой менее 30 кДа;

5 – животные с моделью ИД, которым вводили фракцию комплексного экстракта ВМИС с молекулярной массой более 30 кДа;

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.

Исследование готовой формы проводили на крысах, распределенных на: 1 – контрольные животные с моделью ИД; 2 – интактные животные; 3 – опытные животные с моделью ИД, которым вводили кормовую добавку в дозе (20 ± 0,2) мг/кг белка.

На протяжении всего эксперимента рацион (ad libitum) крыс состоял из полнорационного комбикорма (Ассортимент-Агро, Россия) и воды для поения, полученной на установке водоподготовки EMD Millipore RiOs™ 50 (Merc Millipore, Германия), минерализованной путем добавления минеральных солей (314–382 мг/л: сульфаты – <1, гидрокарбонаты – 144–180, калий – 50–58, хлориды – 60–76, магний – 3, кальций – 6, натрий – 50–58), температура (10-12) °С. На 31-е сутки эксперимента крыс усыпляли в камере для эвтаназии (VETtech) в соответствии с Директивой 2010/63/EU Европейского парламента и совета Европейского союза по охране животных, используемых в научных целях.

У оглушенных животных отбирали из правого желудочка сердца кровь: иммунофенотипирование клеток крови проводили на автоматическом проточном цитофлуориметре Guava easyCyte (MerchMillipore, Франция), используя видоспецифичные моноклональные антитела CD3+, CD4+, CD19+, CD20+, расчитывали иммунорегуляторный индекс как соотношение CD3 к CD4; иммуноферментное исследование – на анализаторе Immunochem 2100 (USA) при

помощи «сэндвич»-метода, используя наборы видоспецифичных реактивов ELISA (rat), определяли Ig M и G, IL 2, 4, 6, компоненты комплемента C5, C3, C4, C1q, циркулирулирующий иммунный комплекс (ЦИК).

Исследование безопасности кормовой добавки проводили на крысах по [ГОСТ 32644-2014, 2015], местно-раздражающего действия - на кроликах по [ГОСТ 32436-2013, 2014] и сенсибилизирующего действия – на морских свинках по [ГОСТ 32375-2013, 2014].

Исследование стабильности кормовой добавки проводили спустя 6 мес и 12 мес хранения при минус (20±2)°С путем измерения оптической плотности с использованием фотоэлектроколориметр Cary 50 («Varian», Австралия). Для подготовки проб каждый из исследуемых растворов объемом 100 мкл доводили до 3 мл физиологическим раствором. Далее, измеряли оптическую плотность полученных растворов при 690 нм против контроля (0,9 % натрия хлорида) [Brady P.N. et al., 2015].

Статистическую обработку данных проводили с использованием ПО "STATISTICA 10,0", вариационного анализа ANOVA в сочетании с тестом Дункана. Уровень значимости принят равным 0,05. Результаты представлены как M±SE.

Глава 3 Результаты исследования

3.1 Обоснование технологических параметров получения биологически активных веществ

3.1.1 Алгоритм выделения биологически активных веществ

В результате анализа различных технологий выделения биоактивных веществ белковой природы из сырья животного происхождения были сформулированы основные этапы, представленные на рисунке 4.

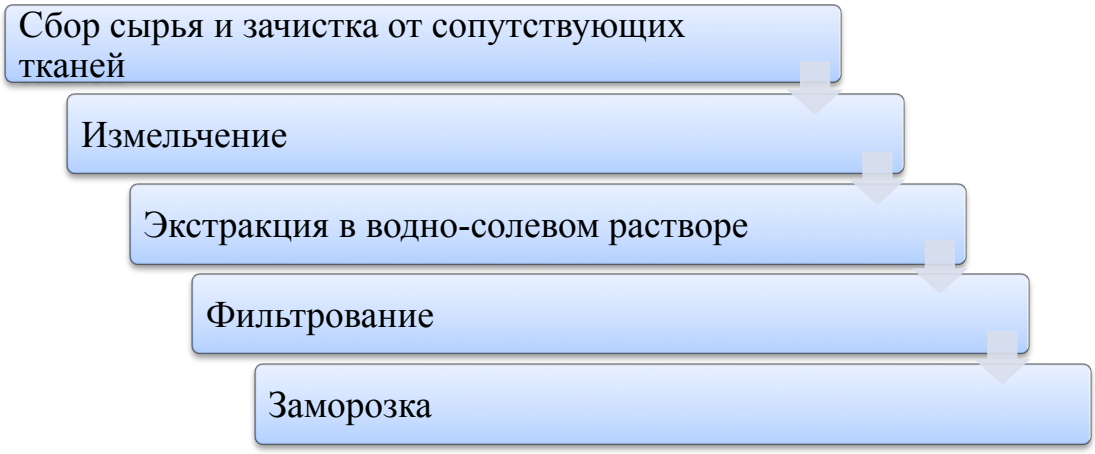


Рисунок 4 – Первичный алгоритм выделения БАВ

Стоит отметить особое значение в технологии получения биологически активных веществ корректного сбора и очистки сырья. Собирают сырье на линии убоя свиней при строгом соблюдении санитарных требований, зачистку от сопуствующих тканей проводят с использованием анатомических ножниц, изогнутых ножниц, ножей.

Рисунок 5 – Внешний вид иммунных органов свиньи: А – тимус, Б – селезенка, В – мезентеральные лимфатические узлы в брыжейке

Зобную железу (тимус) извлекают после нутровки или до нутровки после распиливания грудной кости у молодняка свиней. Тимус в развитом состоянии имеется только у молодых животных, располагается в грудной полости и на шее

животного. В случае сбора тимусов следует обратить внимание, что при распиловке железа может быть разделена на две части. Сначала отделяют грудную часть железы, а затем шейную, лежащую вдоль трахеи. Очистка железы заключается в отделении при помощи ножниц, сгустков крови, жира и соединительной ткани.

Селезенку свиньи сначала осторожно отделяют от рубца вручную или с помощью ножниц, острого ножа, чтобы не повредить паренхиму. После этого селезенку раскладывают на столе и от нее отделяют остатки соединительной ткани и жира.

Мезентеральные лимфатические узлы расположены в брыжейке. Брыжейку отделяют от кишечника, раскладывают на столе и аккуратно извлекают лимфатические узлы, которые можно увидеть сквозь молочно-белую ткань брыжейки – они просвечивают темными плотными пятнами. Извлекать узлы следует с использованием ножниц, острого ножа.

Очищенные органы консервируют в камере для замораживания при температуре не выше 20°С поштучно или блоками.

Для определения оптимальных показателей массового содержания белка, жира, золы и влаги был проведен физико-химический анализ иммунных органов. Результаты приведены в таблице 1. Приведенные величины являются средними из 3-х определений.

Таблица 1 - Химический состав иммунных органов свиньи, %

Наименование показателя	Орган		
	Тимус	Селезенка	МЛУ
Белок	16,23 ± 0,22	19,25 ± 0,19	12,94 ± 0,13
Жир	13,46 ± 2,01	1,42 ± 0,23	24,05 ± 1,90
Зола	1,74 ± 0,24	1,67 ± 0,21	1,25 ± 0,17
Влага	68,39 ± 5,54	77,66± 6,10	61,76 ± 4,91

Мезентеральные лимфатические узлы характеризуются высоким содержанием жира и достаточно низким белка – 24 % и 13 %, соответственно. В селезенке обнаружено значительное содержание белка (19 %) при низком содержании жира (1 %). Тимус характеризовался более равномерным распределением белка и жира (16 % и 13 %, соответственно). Данное распределение белка и жира обусловлено особенностями строения данных органов.

Подготовка сырья к экстракции имеет важное значение в процессе извлечения биоактивных соединений белковой природы. Так, для повышения эффективности процесса экстракции сырье подвергается измельчению для разрушения мембран и клеточных стенок. Наиболее оптимальным механическим способом их деструкции является измельчение ножами, так и перетирание в ступке с абразивными материалами или ударные воздействия мельчайших шариков [Салова Т.Ю., Громова Н.Ю., 2016].

В ходе процесса экстракции необходимо учитывать склонность белковых молекул денатурировать, в связи с этим в процессе выделения следует контролировать значение pH, избегая сильно-кислых и сильно-щелочных сред, при необходимости используя буферные растворы, применения реагентов, приводящих к денатурации белка. Особенностью сырья животного происхождения является необходимость проводить процедуру экстракции белка при низкой температуре (4-10 °C) [Кашинова Э.Б. и др., 2016].

Помимо этого, на ход экстракции большое влияние оказывает солюбилизирующий агент. Так, использование щелочного и кислотного экстрагентов приводит к денатурации и осаждению белков из раствора, что делает их недоступными для изучения. Водно-солевой 0,9 % раствор натрия хлорида является оптимальным по значению pH, осмотическому давлению, являясь схожим с жидкими средами организма, кроме того, содержание соли увеличивает растворимость белков. Стоит отметить, что по литературным данным количество экстрагента при экстракции должно превышать количество исходного сырья в 4-5 раз [Котенкова Е.А. и др., 2014].

Другим важным моментом в рассматриваемом процессе является время экстракции и скорость оборотов при перемешивании. За короткое время выделение проходит не в полной мере, при длительном экстрагировании может происходить автолиз. При слишком высоких оборотах перемешивающего стержня может наблюдаться активное пенообразование при выделении, которое мешает дальнейшей работе. А при низких скоростях отмечаются низкие проценты выхода биологически активных веществ в раствор.

Таким образом, предварительная схема получения биологически активных веществ включала в себя следующие основные стадии: сбор сырья и зачистку от сопуствующих тканей (соединительно-тканной капсулы, жира и т.д.), измельчение (до размера частиц не более 3-4 мм), экстракцию в 0,9 % водно-солевом растворе хлорида натрия с использованием магнитной мешалки и стандартного магнитного перемешивающего элемента цилиндрической формы (6 х 25 мм) для универсального перемешивания, со скоростью вращения магнитного стержня 1200 об/мин при объеме экстракта для перемешивания до 0,3 л в течение 24 час при температуре (5 ± 3) °С, фильтрование с использованием ватно-марлевого фильтра, заморозку экстракта при температуре не выше минус 40 °С.

По данному алгоритму были получены индивидуальные экстракты селезенки, тимуса и мезентеральных лимфатических узлов, а также комплексный экстракт, представляющий собой смесь индивидуальных экстрактов в пропорции 1:1:1.

3.1.2 Результаты изучения аминокислотного состава и белкового профиля полученных экстрактов

Характерной особенностью аминокислотного состава комплексного экстракта и индивидуальных экстрактов (таблица 2) является высокое содержание кислых аминокислот, аспарагиновой и глутаминовой.

Содержание Asp в экстрактах селезенки, мезентеральных лимфатических узлов (МЛУ), тимуса и комплексного экстракта составляет 9,7; 9,8; 10,5 и 10,6 мольных процента, соответственно, что отражает суммарное содержание свободной Asp, входящей в структуру белков, экстрагированных из органов

свиней. Кроме того, сюда же включается суммарное содержание свободного и связанного аспарагина, Asn, образующего Asp в процессе кислотного гидролиза.

Содержание глутаминовой кислоты, Glu, в экстрактах селезенки, мезентеральных лимфатических узлов (МЛУ), тимуса и комплексного экстракта составляет 12,3; 12,6; 9,5 и 11,5 мольных процента, соответственно. Как и в случае Asp, эти данные отражают суммарное содержание свободной Glu и связанной в структуре белков Glu. Одновременно они включают суммарное содержание глутамина, Gln, свободного и входящего в структуру экстрагированных белков, превращающегося в Glu в ходе кислотного гидролиза.

Среди нейтральных гидрофильных аминокислот несколько выше содержание глицина и аланина, причем их содержание достаточно однородно и находится в интервале от 9,3 до 10,4 мольных процентов.

Содержание Gly изменяется от 9,4 в комплексном экстакте до 10,4 мольных процента в экстракте тимуса. Содержание Ala колеблется от 9,3 мольных процента в экстракте селезенки и комплексном экстракте до 9,9 мольных процента в экстракте МЛУ. Содержание Thr, Ser и Pro несколько ниже: в экстрактах селезенки, мезентеральных лимфатических узлов (МЛУ), тимуса и комплексного экстракта содержание Thr составляет 5,0; 5,3; 5,9 и 6,2 мольных процента, Ser – 6,1; 6,38 6,9 и 7,0 мольных процента, Pro –6,6; 6,1; 5,5 и 5,5 мольных процента, соответственно.

Среди нейтральных гидрофобных аминокислот преобладают лейцин (до 9,2 мольных процента в экстракте селезенки) и валин (до 7,3 мольных процента в экстракте тимуса).

Изолейцин, тирозин и фенилаланин образуют группу нейтральных гидрофобных аминокислот с меньшим содержанием – до 5,3 мольных процента Ile в экстракте тимуса, 3,9 мольных процента Phe для всех экстрактов, до 2,8 мольных процента Ile в экстракте тимуса.

Отдельную группу составляют основные аминокислоты, лизин, гистидин и аргинин, среди которых наиболее велико содержание лизина.

В экстрактах селезенки, МЛУ, тимуса и комплексном экстракте содержание Lys составляет 7,9; 7,9; 7,2 и 8,3 мольных процента, соответственно; Arg – 4,6; 4,7; 4,6 и 4,5 мольных процента, His – 2,9; 2,6; 2,2 и 2,2 мольных процента, соответственно. Метионин в экстрактах не обнаружен.

Таблица 2 - Содержание аминокислот в индивидуальных экстрактах иммунных органов и комплексном экстракте, мол. %

Аминокислота	Селезенка	МЛУ	Тимус	Комплексный экстракт
Аланин	9,3	9,9	9,5	9,3
Аргинин	4,6	4,7	4,6	4,5
Аспарагиновая кислота	9,7	9,8	10,5	10,6
Валин	6,9	6,6	7,3	6,4
Гистидин	2,9	2,6	2,2	2,2
Глицин	9,5	10,1	10,4	9,4
Глутаминовая кислота	12,3	12,6	9,5	11,5
Изолейцин	3,8	3,6	5,3	4,1
Лейцин	9,2	8,3	8,5	8,4
Лизин	7,9	7,9	7,2	8,3
Пролин	6,6	6,1	5,5	5,5
Серин+ глутамин	6,1	6,3	6,9	7,0
Тирозин	2,2	2,4	2,8	2,8
Треонин+ Аспарагин	5,0	5,3	5,9	6,2
Фенилаланин	3,9	3,9	3,8	3,8

Анализ содержания свободных аминокислот в комплексном экстракте и индивидуальных экстрактах (таблица 3) показал достаточно высокое содержание глутаминовой кислоты, глицина и аспарагиновой кислоты в экстрактах мезентеральных лимфатических узлов и селезенки: Glu – 19,8 и 17,4 мольных процента; Gly – 14,6 и 13,0 мольных процента; Asp – 8,5 и 9,1 мольных процента, соответственно.

В то же время в экстракте, полученном на основе тимуса, и в комплексном экстракте содержание этих аминокислот заметно ниже: Glu – 7,7 и 10,1; Gly – 5,2 и 10,7; Asp – 3,4 и 6,3 мольных процента, соответственно.

Среди нейтральных аминокислот в комплексном экстракте наиболее высоко содержание аланина (Ala – 10,4 мольных процента). При этом содержание аланина во всех остальных экстрактах находится примерно на этом же уровне (селезенка – 9,5; МЛУ – 9,5; тимус – 9,4 мольных процента).

Следующую группу аминокислот составляют нейтральные гидрофильные аминокислоты: сумма серин и глутамин, треонин и аспарагин, а также пролин (в ходе проведения аминокислотного анализа не удалось добиться полного разделения аминокислот Ser – Gln и Thr – Asn). Как и в случае аланина, содержание этих аминокислот в анализируемых образцах находится примерно на одном уровне: пара Ser – Gln в селезенке, МЛУ, тимусе и комплексном экстакте, соответственно, 7,9, 7,6, 7,9 и 8,6 мольных процента; пара Thr – Asn в этих же образцах 5,6, 5,0, 4,7 и 4,7 мольных процента, сотоветственно. Наконец, Pro: 6,0, 6,0, 5,3 и 5,1 мольных процента, соответственно.

Среди гидрофобных аминокислот: валин, лейцин, изолейцин, тирозин и фенилаланин, наиболее высоко содержание лейцина в экстракте тимуса комплексном экстакте: 12,8 и 9,2 мольных процента, соответственно. В то же время в экстрактах селезенки и лимфатических узлов содержание этой аминокислоты заметно ниже (6,3 и 5,0 мольных процента, соответственно).

Интересно отметить, что экстракт тимуса содержит несколько большие количества и других гидрофобных аминокислот в сравнении с селезенкой и МЛУ. Так, содержание валина в экстракте тимуса составляет 7,4 мольных процента, изолейцина – 6,5 мольных процента, тирозина – 4,5 и 3,4 мольных процента, фенилаланина – 4,9 и 3,9 мольных процента.

Среди основных аминокислот, лизина, гистидина и аргинина, можно отметить несколько более высокое содержание лизина во всех образцах в сравнении с двумя другими основными аминокислотами.

Содержание лизина в селезенке, МЛУ, тимусе и комплексном экстакте составляет 5,9, 6,8, 8,9 и 9,5 мольных процента, аргинина – 3,7, 3,8, 672 и 6,1 мольных процента, гистидина – 1,7, 1,6, 2,3 и 2,0 мольных процента, соответственно.

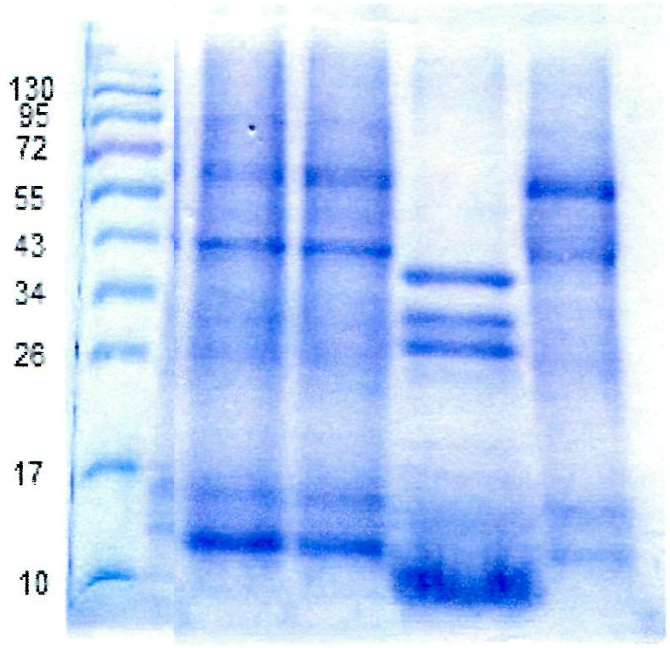
Метионин обнаружен только в экстракте тимуса – 2,4 мольных процента, а также в комплексном экстракте – 1,5 мольных процента.

Таблица 3 - Содержание свободных аминокислот в индивидуальных экстрактах иммунных органов и комплексном экстракте, мол. %

Аминокислота	Селезенка	МЛУ	Тимус	Комплексный экстракт
Аланин	9,5	9,5	9,4	10,4
Аргинин	3,7	3,8	6,7	6,1
Аспарагиновая кислота	9,1	8,5	3,4	6,3
Валин	4,8	4,2	7,4	4,5
Гистидин	1,7	1,6	2,3	2,0
Глицин	13,0	14,6	5,2	10,7
Глутаминовая кислота	17,4	19,8	7,7	10,1
Изолейцин	3,3	2,7	6,5	3,8
Лейцин	6,3	5,0	12,8	9,2
Лизин	5,9	6,8	8,9	9,5
Метеонин	-	-	2,4	1,5
Пролин	6,0	6,0	5,3	5,1
Серин+ глутамин	7,9	7,6	7,9	8,6
Тирозин	2,8	2,4	4,5	3,4
Треонин+ Аспарагин	5,6	5,0	4,7	4,7
Фенилаланин	2,9	2,5	4,9	3,9

В результате электрофоретического разделения исследованных образцов в полиакриламидном геле концентрации 12,5 % (рисунок 6) выявлено, что все они являются многокомпонентными смесями, содержащими белки в широком диапазоне молекулярных масс. Экстракты селезенки и мезентеральных лимфатических узлов имеют достаточно высокую степень соответствия. Это

можно объяснить сходными физиологическими функциями этих органов в области иммунорегуляции. Оба экстракта содержат, как минимум, по 6 белковых зон в диапазоне молекулярных масс от 60 до 15 кДа.



1 2 3 4 5

Рисунок 6 - SDS-электрофорез образцов в 12,5% полиакриламидном геле.

- 1. Стандарт молекулярной массы (130 кДа – 10 кДа)
- 2. Экстракт селезенки
- 3. Экстракт мезентеральных лимфатических узлов
- 4. Экстракт тимуса
- 5. Комплексный экстракт

Высокая степень индивидуальности экстракта тимуса вполне соответствует имеющимся представлениям о функционировании данного органа. В экстракте тимуса обнаружены три белковых зоны в области от 36 до 26 кДа и очень интенсивная полоса в области 10 кДа.

Комплексная смесь экстрактов содержит практически все белковые зоны, обнаруженные в индивидуальных экстрактах. Это доказывает, что эффективное системное действие данного средства складывается из суммарного физиологического действия каждого из входящих компонентов.

При дальнейшем анализе электрофореза была использована электронная база данных UniProt, с помощью которой можно предположительно определить

вещества, содержащиеся в исследуемых образцах, и которые, вероятно, способны проявиться при электрофорезе, поскольку в базе данных указаны молекулярные массы соединений. Также была проведена дифференцировка по функции соединений.

По полученным данным можно предположить, что треки, выявленные при анализе экстрактов тимуса, селезенки, мезентеральных лимфатических узлов соответствуют данным веществам (таблица 4).

Таблица 4 – Вещества, предположительно содержащиеся в индивидуальных экстрактах иммунных органов свиньи

Название вещества	Молекулярная масса, Да
1	2
Экстракт тимуса	
Негистоновые хромосомные белки	9379
Тирозинкиназа-связывающий белок	11617
Ингибитор лейкоцитов цистеинпротеаза-1	11767
Интерлейкин-17А	17312
Антиген лейкоцитов	33253
Гуанин нуклеотид-связывающий белок	35077
Клеточный опухолевый антиген	42862
Тирозин-протеинкиназа	71620
Компонент комплемента С7	93062
Экстракт селезенки	
Ацил-связывающий белок	9896
Гликопротеин	13790
Лизоцим С-1	14668
Интерлейкин-7	20161
Лиганд CD40	28869
Гемоксигеназа 1	33074
Гуанин нуклеотид-связывающий белок бета-2-1	35077
Интерлейкин-12 бета	36829
Гиалуронидаза-1	48507

Продолжение таблицы 4

1	2
Тирозин-протеинкиназа	71620
Арахидонат липоксигеназы	75004
Экстракт мезентеральных лимфатических узлов	
Лимфотоксин-бета	16423
Интерлейкин-15	18365
Лимфотоксин-альфа	21960
Прогепарин-связывающий фактор роста	22986
Белок-адаптер	33254
Трансмембранный белок	41881
Иммунный рецептор	107584

В результате проведенных исследований был показан высокий потенциал исследуемых объектов. Для получения более широкого спектра биологически активных соединений появилась необходимость модификации технологических параметров и экстрагента.

3.1.3 Модификация технологической схемы выделения БАВ и результаты исследования полученных БАВ

Дальнейшая работа над технологией была ориентирована на модификацию технологических параметров процесса с целью получения большего выхода активных соединений в раствор во время экстракции за счет применения современных техничеств средств.

Для экстракции биологически активных веществ животного происхождения сегодня применяют специальные приспособления – гомогенизаторы, состоящие из стакана с вращающимися режущими металлическими лопастями (гомогенизаторы Уорринга) или из стеклянного цилиндра и притертого к его стенкам стеклянного или тефлонового поршня (гомогенизаторы Поттера). Тефлоновые поршни используют в тех случаях, когда необходимо применять менее жесткие воздействия и получать неповрежденные мембраны и субклеточные органеллы. Для более качественной гомогенизации применяются

специальные гомогенизаторы под давлением типа френч-прессов, принцип действия которых заключается в продавливании клеточной массы под большим давлением через мембрану с размером пор меньшим диаметра клеток. Также наибольшее применение получила аппаратура, детали которой изготовлены из нержавеющей стали, вследствие высокой огнестойкости и большой кислотоустойчивости. К таким приспособлениям относится лабораторная диспергирующая установка («Лаботекс», Россия). С использованием данного оборудования наиболее оптимальной скоростью перемешивания экстракта является 400 об/мин ввиду определенных преимуществ: незначительное образование пены, достаточно низкое время экстракции и небольшая вероятность ферментолиза и автолиза [Котенкова Е.А. и др., 2014]. Для более полного разрушения клеточной стенки в конце экстракции рекомендуется повышение скорости перемешивания до 3000 об/мин в течение 3 мин.

Этап фильтрации с использованием ватно-марлевого фильтра не позволяет очистить экстракты от лишних элементов, включая балластные соединения. Технологические решения последних лет свидетельствуют о том, что центрифугирование при небольших скоростях (12 000 об/мин) позволяет получить супернатант, содержащий минимальное количество взвеси.

Также исследования последних лет показывают, что на иммуномоделирующую и адаптогенную активность биомолекул существенное влияние оказывает солюбилизирующий агент [Pershin S.M. et al., 2017] и его изотопный состав, в том числе соотношение водород-дейтерий.

Вода с модифицированным изотопным составом со сниженным содержанием дейтерия (ВМИС, «лёгкая вода») является изотопологом воды $^{1}H_2{}^{16}O$, образованной лёгкими стабильными изотопами входящих в его состав элементов. ВМИС как моноизотопная композиция $^{1}H_2{}^{16}O$ является особенным случаем случаем изотопной чистоты и не существует в естественных условиях. Получение изотополога $^{1}H_2{}^{16}O$ проводится путем тонкой многостадийной очистки природных вод либо путем синтеза из исходных элементов $^{1}H_2$ и ^{16}O. Природная вода представляет собой многокомпонентную смесь изотопологов, в 1000000

молекул которой в среднем содержится 997284 молекул $^{1}H_2{}^{16}O$, 311 молекул $^{1}HD^{16}O$, 390 молекул $^{1}H_2{}^{17}O$, и около 2005 молекул $^{1}H_2{}^{18}O$. Концентрация молекул воды, содержащих тяжёлые изотопы D, ^{17}O, ^{18}O, в природной воде колеблется в пределах стандартов изотопного состава гидросферы SMOW и SLAP.

Интерес к воде с пониженной концентрацией изотопов, связан с ее специфическим влиянием на биологические процессы. Вода с пониженным содержанием дейтерия обладает стимулирующим действием на репродуктивную функцию организма и не оказывает токсического действия на организм лабораторных животных; длительное употребление воды с пониженным содержанием дейтерия приводит к снижению степени тяжести лучевых повреждений, обусловленных действием гамма- излучения в низких дозах в условиях ежедневного воздействия [Strekalova T. et al., 2015]. Российские ученые изучали влияние воды с пониженным содержанием дейтерия на показатели крови лабораторных мышей, страдающих сахарным диабетом [Goncharuk V. V. et al., 2013]. Также доказано, что ВМИС ССД является эффективным ингибитором пролиферации клеток NPC [Cong F. S. et al., 2010], а кроме того, оказывает влияние на рост и других опухолевых клеток. В другой работе показано, что сама по себе ВМИС не влияет на продолжительность жизни червей Caenorhabditis elegans, однако, ее применение отменяет Mn-индуцированное сокращение жизни [Rehakova R. et al., 2016]. Проведенные на животных эксперименты показали, что ВМИС в питьевом рационе улучшает работу печени и почек, обладает ярко выраженными нефро- и гепатозащитными свойствами по отношению к химическим ядам, в том числе к химиопрепаратам, применяемым в онкологии, повышает неспецифический иммунитет животных. Доказано, что влияние воды с модифицированным изотопным (D/H) составом на млекопитающих на организменном уровне наблюдаются изменения функциональной активности ряда органов и систем: отмечается изменение скорости метаболических процессов в центральной нервной системе, гормональной регуляции, деятельности органов функциональной системы выведения токсинов из организма, а также снижение экспрессии маркеров опухолей. Доказано, что снижение концентрации дейтерия в

жидкостях организма способствует активации адаптогенных процессов [Zlatska A. et al., 2018; Avila D.S. et al., 2012] за счет изменения активности ферментов. Для большинства физиологических процессов изотопный эффект связан со скоростью деления клеток [Rasooli A. et al., 2018].

Таким образом, возникло предположение, что за счет модификации физико-химических свойств растворителя путем изменения соотношения легких и тяжелых изотопов в его составе, становится возможным получение широкого спектра биологически активных веществ животного происхождения. В соответствии с проанализированным материалом были выбраны методы и средства, направленные на выделение биомолекул из животного сырья, включающие экстракцию в водно-солевом агенте, приготовленном на основе воды с модифицированным изотопным D/H составом (ВМИС).

Рисунок 7 – Модифицированная схема получения экстрактов на основе ВМИС и ДВ

Для научного обоснования технологии выделения биологически активных веществ проводили водно-солевую экстракцию по схеме, представленной на

рисунке 7, с использованием лабораторной диспергирующей установки (Лаботекс, Россия) при гидромодуле 1:5 и температуре 4°С с варьированием содержания дейтерия в солюбилизирующем агенте (140 ppm – ДВ, 40 ppm – ВМИС).

Далее представлены результаты исследований процессов экстракции и полученных по модифицированной схеме экстрактов. Смешивание индивидуальных экстрактов проводили в соотношении 1:1:1 исходя из концентрации белка в индивидуальных экстрактах.

Было показано влияние солюбилизирующего агента на время экстракции и концетрацию белка в образцах (таблица 5). При экстракции селезенки максимальное содержание белка было достигнуто на 75 минуте эксперимента и составило в физиологическом растворе ВМИС 25,5±0,2 г/л, в растворе на основе ДВ – на 20 % ниже (20,4±0,4 г/л).

Таблица 5 – Концентрация белка в экстрактах, г/л

Время,мин	Селезенка		Тимус		Лимфатические узлы	
	ВМИС	ВД	ВМИС	ВД	ВМИС	ВД
0	3,77±0,23	3,75±0,30	4,44±0,27	4,46±0,26	6,69±0,09	6,58±0,16
15	22,10±0,30	18,00±0,41	17,70±0,21	10,30±0,58	16,00±0,73	11,70±0,37
30	23,30±0,13	18,10±0,19	**18,90±0,15**	10,80±0,10	18,60±0,14	11,90±0,12
45	24,40±0,41	19,50±0,43	18,10±0,32	**11,70±0,25**	19,10±0,67	**12,60±0,38**
60	23,80±0,58	20,30±0,43	17,60±0,43	11,00±0,64	19,00±0,56	11,00±0,23
75	**25,50±0,15**	**20,40±0,40**	17,50±0,70	11,10±0,11	**19,50±0,47**	11,70±0,80
90	24,00±0,63	19,50±0,54	17,30±0,61	11,00±0,76	19,50±0,20	11,50±0,67
120	24,10±0,24	20,10±0,17	17,50±0,43	11,20±0,57	19,40±0,16	11,60±0,46

При экстракции тимуса в физиологическом растворе ВМИС максимальное содержание белка составило 18,9±0,2 г/л на 30 мин эксперимента, в то время как при экстракции в растворе на основе ДВ максимальное значение содержания белка было на 38 % ниже (11,7±0,3 г/л) на 45 мин экстракции. При экстракции мезентеральных лимфатических узлов в физиологическом растворе ВМИС максимальное содержание белка составило 19,5±0,47 г/л на 75 мин эксперимента, в то время как в растворе на основе ДВ уровень белка достиг максимума на 45

минуте экстракции и был на 35 % ниже (12,6±0,38 г/л). Разница по содержанию белка между «нулевыми пробами» соответствующих экстрактов на основе изучаемых солюбилизирующих агентов до начала эксперимента не превышала 0,1 г/л.

Степень экстракции была рассчитана по формуле (2) для каждого индивидуального органа в конечной точке экстракции. Результаты представлены в таблице 6.

Таблица 6 – Степень экстракции белков из иммунных органов свиньи

Орган	Степень экстракции, %	
	ДВ	ВМИС
Тимус	39,07	67,09
Селезенка	49,47	60,7
МЛУ	82,87	87,75

При расчете скоростей экстракции было выявлено наибольшие значения у экстрактов на основе ВМИС относительно ДВ. В некоторых образцах они были подсчитаны для двух отрезков. Результаты расчетов скоростей представлены в таблице 7.

Таблица 7 – Значение скоростей выхода белка в исследуемых образцах,

Орган	Значения скоростей, мг*ч/мл	
	ДВ	ВМИС
Тимус	1,615	9,745
Селезенка	2,92	3,85
МЛУ	8,48	2,95

Предположительно, увеличение концентрации белка, увеличенную степень экстракции и скорость выхода белка в экстрагент, приготовленный на основе ВМИС, можно объяснить изотопными эффектами солюбилизирующего агента. Так, химические реакции в D_2O протекают с более медленной скоростью, чем в H_2O; D_2O слабее ионизирована, чем H_2O; константа диссоциации D_2O меньше таковой для H_2O; растворимость органических и неорганических веществ в D_2O,

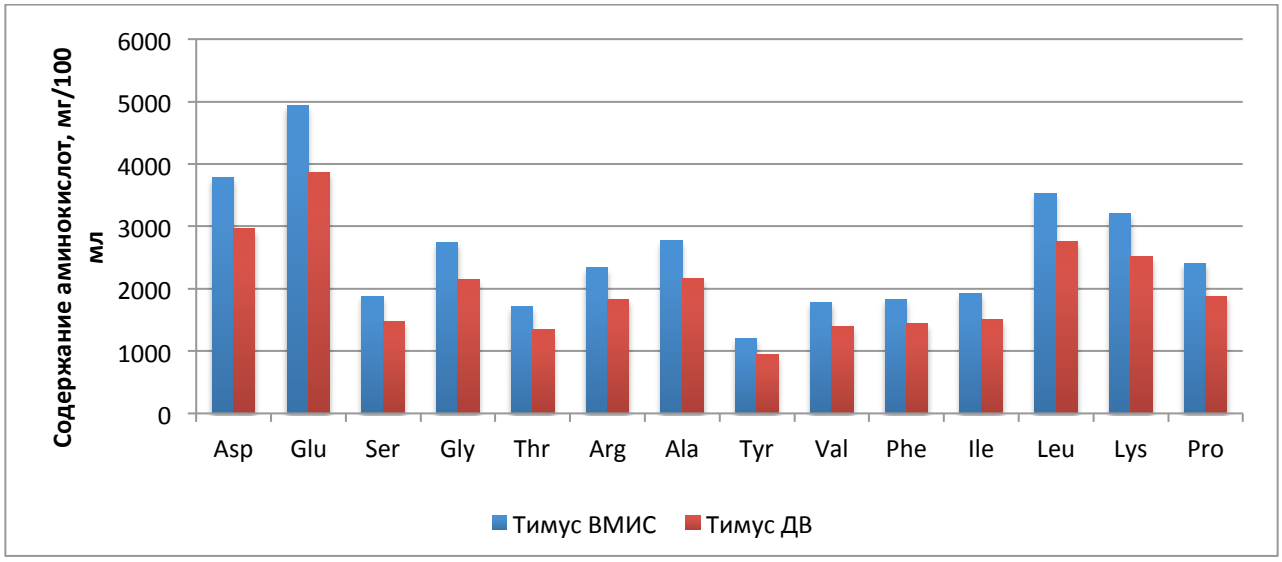
как правило, ниже, чем в H_2O а также водородные связи с участие дейтерия несколько прочнее обычных. Различие в количестве выделенных белково-пептидных комплексов могут быть обусловлены их структурно-функциональной перестройкой в процессе адаптации к измененной концентрации дейтерия.

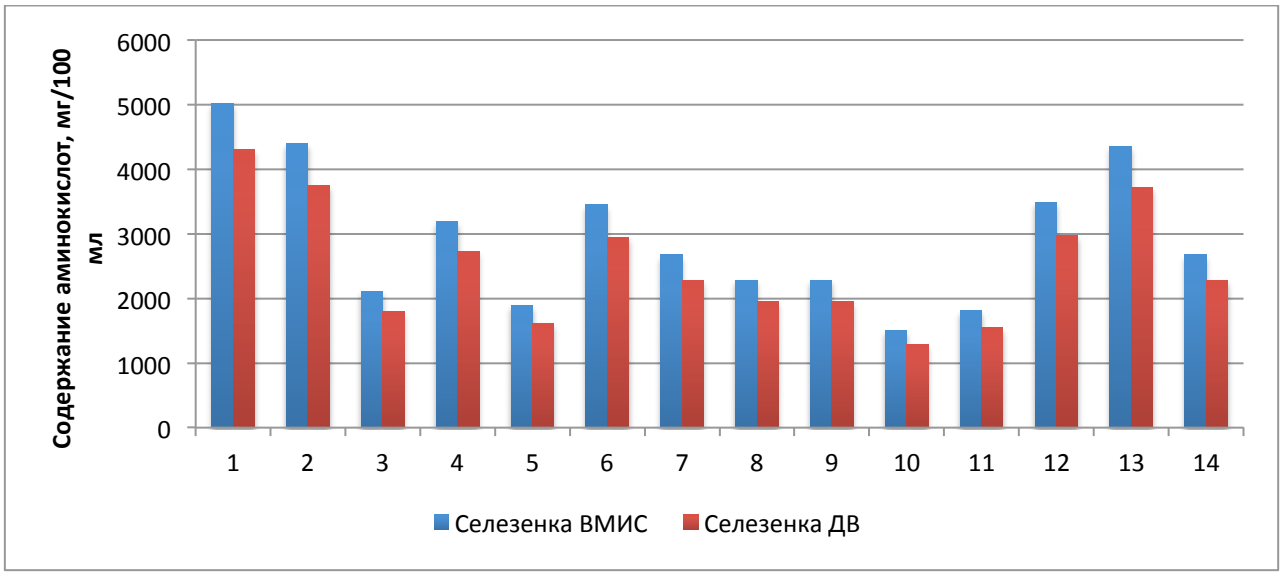
Результаты аминокислотного анализа индивидуальных экстрактов выявили высокое их содержание в экстракте лимфатических узлов на основе ВМИС (Рисунок 8). Во всех экстрактах обнаружено значительное количество нейромедиаторных аминокислот, таких как аспаргиновая и глутаминовая кислоты, глицин (тимус – 10,5 %; 13,7 %; 7,6 %; селезенка – 12,2 %; 10,7 %; 7,8 %; лимфатические узлы – 11,0 %; 13,3 %; 11,1 %, соответственно), обладающих иммунологической и адаптогенной активностью. Важно отметить достаточно высокое содержание аргинина и лизина, вовлеченных в иммунный ответ; тирозина и треонина, участвующих в адаптогенных механизмах; серина, аланина, валина, образующих активные центры ряда ферментов, а также изолейцина, лейцина и пролина, участвующих в энергетическом обмене.

Показано выраженное увеличение количественного содержания гидрофильных аминокислот в экстрактах на основе ВМИС относительно экстрактов на основе дистиллированной воды: в экстракте тимуса – до 22 %, селезенки до 15 %, лимфатических узлов до 8 %, соответственно.

В результате фракционного анализа экстрактов лимфоузлов, тимуса, селезенки и их смеси была получена следующая электрофореграмма (рисунок 9).

Было обнаружено 83 фракций у экстрактов на основе дистиллированной воды и 85 у экстрактов на основе ВМИС. Присутствует мажорная белковая зона в области 12,5 кДа и 70 кДа; минорные полосы 10-12,5 кДа, 15-25 кДа, 30-37 кДа, а так же 70-250 кДа (70-85 кДа, 100-150 кДа, 159-250 кДа), четкие отдельные полосы в диапазоне 40-100 кДа (43-52 кДа, 55-79 кДа,95 -100 кДа); ярко выраженная белковая зона в диапазоне от 12,5-15,5 кДа и от 45 до 85 кДа; не обнаружены низкомолекулярные соединения до 12,5 кДа и высокомолекуляные соединения 109- 125 кДа, 150-250 кДа.





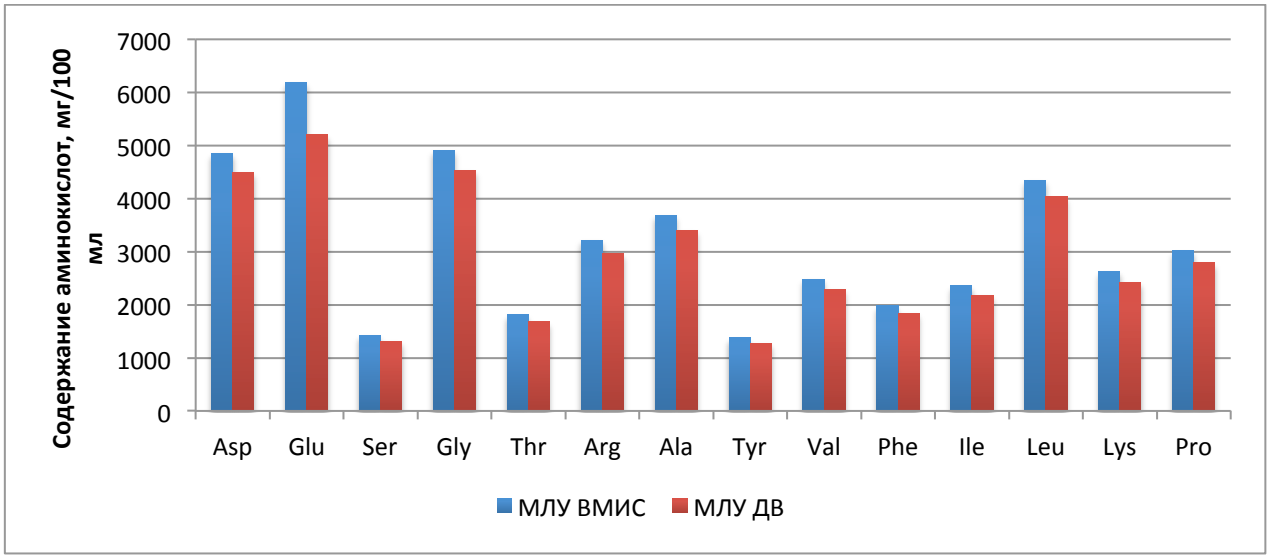


Рисунок 8 – Сравнительное содержание аминокислот в экстрактах иммунных органов свиньи на основе ВМИС и ДВ

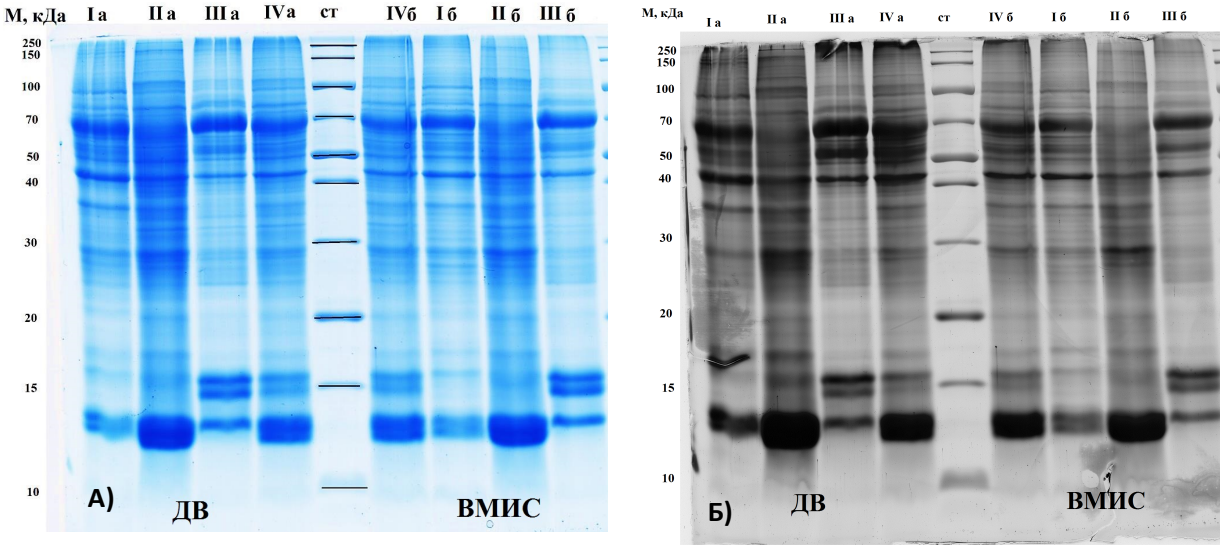


Рисунок 9 – Электрофореграмма 12,5 % ПААГ при окрашивании Кумасси (А) и азотнокислым серебром (Б). Условные обозначения: Ст - маркеры молекулярной массы (250, 150, 100, 70, 50, 40, 30, 20, 15, 10 и 5 кДа); Iа и Iб – экстракт тимуса; IIа и IIб – экстракт селезенки; IIIа и IIIб – экстракт лимфатических узлов; IVа и IVб – смесь экстрактов.

При анализе электрофореграммы после серебрения, было отмечено соответствие результатов с данными, полученными при электрофорезе в 12,5 % ПААГ, окрашенного Кумасси G-250 (рисунок 9).

Электрофореграммы белковых фракций анализировали с помощью базы данных UniProt Proteindatabase и многоуровневой информационной базой данных «Протеомика мышечных органов» (таблица 8).

Таблица 8 – Теоретический качественный состав исследуемых образцов

Наименование соединения	MW, кДа
1	2
Миозин-7А	250,7 кДа
Белок тирозинфосфатаза, рецептор типа К	150,4 кДа
Оксистерол-связывающий белок	110 кДа
Фосфодиэстераза	100 кДа
Аминопептидаза	96 кДа
Основной белок полимеразы 2	85 кДа
Глютамин-синтетаза НАД (+)	79 кДа
RBC-тип Е3-убиквитин-трансфераза (убиквитинлигаза)	78 кДа
Тропомиозин 1	70 кДа

Таблица 8. Продолжение

1	2
Гликопротеин G	67 кДа
Долил-фосфат-манноза - белковая маннозилтрансфераза	65 кДа
Протеинкиназа 3 SRSF	64 кДа
Глюкоза-6-фосфатная изомераза	63 кДа
Рецепторный белок серин / треонинкиназа	60 кДа
Кальций / кальмодулинзависимая протеинкиназа II альфа	55 кДа
Белок промежуточных филаментов десмин	53 кДа
Тубулин альфа-1B-цепь	50 кДа
Фосфоглицераткиназа 1	44,5 кДа
G - актин	43кДа
Мышечный специфический RING-белок-1	40 кДа
Актинин-ассоциированный белок LIM 1a	39,5 кДа
Актин, альфа-скелетная мышца	38 кДа
Серин / треонин-белковая фосфатаза PP1-бета-каталитическая субъединица	37 кДа
Рецептор активированного белка С-киназы 1	35 кДа
Тропомиозиновая альфа-3-цепь	33 кДа
Тропонин Т, быстрая скелетная мышца	32,1 кДа
Тропонин Т, медленная скелетная мышца	31,2 кДа
Тропонин Т2, сердечный тип	29 кДа
Тропомиозиновая альфа-4-цепь	28,5 кДа
Глутатион S-трансфераза омега-1	27,4 кДа
Убиквинтин карбокси-концевая гидролаза изозим L3	26 кДа
Простагландин-H2-D-изомераза	20,5 кДа
Тропонин С, скелетные мышцы	18 кДа
Кавеолин-3	17,5 кДа
Миоглобин myoglobin [Sus scrofa]	17 кДа
Миозиновый легкий полипептид 6	16,9 кДа
Миозин легкая цепная киназа, гладкая мышца	16 кДа
60S рибосомальный белок L23	15 кДа
Фосфопротеин 19	12,5 кДа
Ингибитор АТФ, митохондриальный	12 кДа
Hsp90 (белок теплового шока 90)	85 кДа
цАМФ-зависимой протеинкиназы типа II-альфа - регуляторная субъединица	17 кДа
Адипоцитарный связывающий белок	14,9 кДа

Наибольшее количество белков находятся в экстрактах тимуса и лимфатических узлов. Также возникло предположение, что 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 эффектор глюкокортикоидов и 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; мезентеральные лимфатические узлы – 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.

В экстракте селезенки преобладает основной белок полимеразы 2, фосфоглицераткиназа 1 и тропонин Т2, сердечный тип. Необходимо отметить, что данный образец имеет наименьшее количество белка тропомиозина 1 (70 кДа) относительно других. В то время как фосфопротеин 19 и ингибитор АТФ, митохондриальный имеют ярко выраженный характер.

В экстракте тимуса в большей степени содержатся такие белки, как оксистерол-связывающий белок, тропонин Т2, фосфоглицераткиназа 1, серин/треонин-белковая фосфатаза PP1-бета-каталитическая субъединица и тропомиозиновая альфа-4-цепь.

В образце лимфатических узлов наибольшее содержание имеют Основной белок полимеразы 2, тропомиозин 1, фосфоглицераткиназа 1, фосфопротеин 19, а также такие как легкая цепь миозина, гладкая мышца и 60S рибосомальный белок L23, которые отсутствуют в экстрактах других органов Sus scrofa. Необходимо отметить, что качественный состав исследуемых экстрактов на основе ДВ и ВМИС для соответствующего органа не отличался. Показано, что соединения, выявленные в индивидуальных экстрактах, также присутствуют в комплексных смесях.

Протеомный анализ комплесных экстрактов на основе воды с пониженным содержанием дейтерия (ВМИС) и на основе дистилированной воды (ДВ) показал, что их основными белковыми компонентами являются 8 фракций, которые, в соответствии с результатами денситометрии, содержат от 11 до 20 % всего белкового материала, визуально обнаруживаемого на 2ДЭ при окрашивании CBB R-250 (таблица 9). Результаты идентификации представлены в таблице 10.

Таблица 9 – Денситометрические характеристики количественного содержания мажорных фракций в комплексных экстрактах

Образцы	Значения интегральной оптической плотности (volume) всего белкового материала	Значения интегральной оптической плотности 8 мажорных белков (% от суммарного количества)
Комплесный экстракт ДВ	753 483 (100%)	126 646 (17%)
Комплесный экстракт ВМИС	1 650 709 (100%)	186 939 (11%)

Для подтверждения наличия соединений, участвующих во вторичном иммунном ответе и ответственных за адаптационные процессы в организме, был проведен анализ белкового профиля комплексных экстрактов методом двумерного электрофореза (рисунок 10).

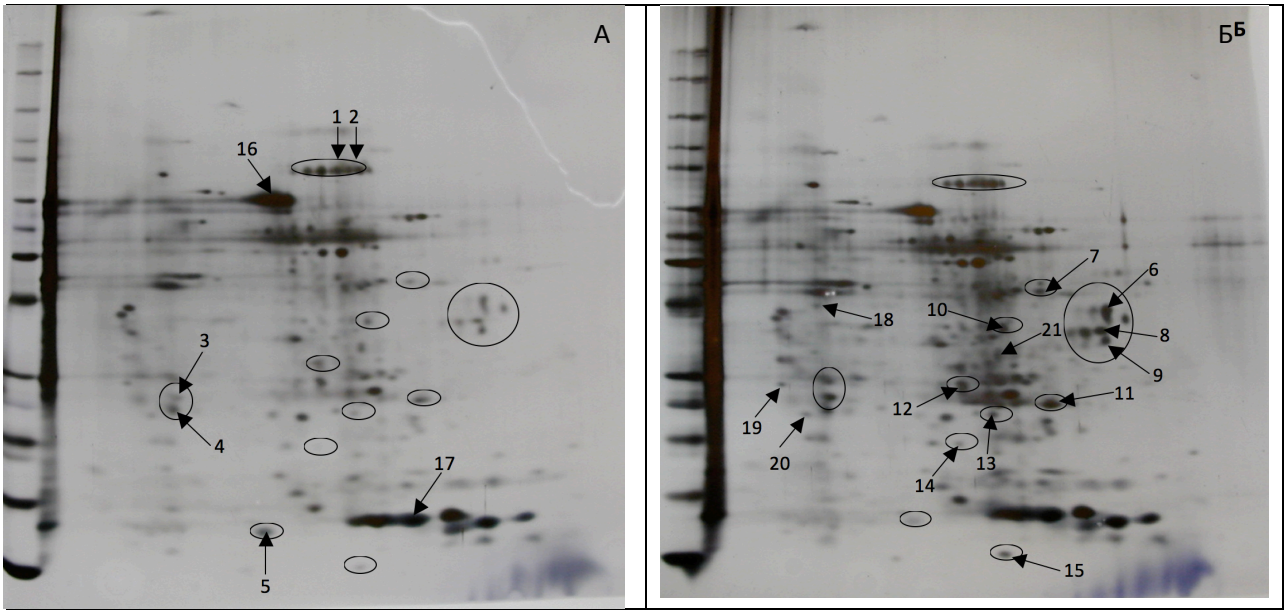


Рисунок 10 - Результаты протеомного анализа смеси экстрактов иммунных органов свиньи на основе ДВ (А) и ВМИС (Б). Условные обозначения: 1 - Интерферон бета протеин; 2 - Гамма-интерферон-индуцируемая-лизосомальная тиол-редуктаза (IFI30); 3 - Миелоидный дифференцирующий белок первичного

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).

Таблица 10 – Результаты масс-спектрометрической идентификации (MALDI-TOF MS и MS/MS) 8 мажорных белковых фракций экстрактов иммунных органов домашней свиньи (Sus scrofa).

№	Наименование белка; некоторые синонимы, (*символ гена*)	Номера в Protein NCBI	**S / M/ C**	MW/pI (эксп.)	MW/pI (расчет.)
1	Hemoglobin subunit beta (*HBB*)+ Deamidated (NQ)	NP 001138313.1	121/35/99	16,0/7,50	16,2/7,10
2	Смесь hemoglobin subunit beta (*HBB*) + Deamidated (NQ)и profilin-1 (*PFN1*)	NP 001138313.1 NP 001231345.1	131/26/96 86/9/	16,0/8,00	16,2/7,10 15,0/8,46
3	Hemoglobin subunit beta (*HBB*) + Deamidated (NQ)	NP 001138313.1	215/21/93	15,2/8,20	16,2/7,10
4	Hemoglobin subunit beta (*HBB*) + Deamidated (NQ)	NP 001138313.1	276/21/67	15,2/8,40	16,2/7,10
5	Hemoglobin subunit alpha (*LOC110259958*) + Lys->Allysine (K)	XP 020942625.1	127/17/83	15,2/8,60	15,2/8,74
6	Hemoglobin subunit alpha (*LOC110259958*) + Lys->Allysine (K)	XP 020942625.1	127/17/92	16,0/9,20	15,2/8,74
7	Смесь hemoglobin subunit beta (*HBB*) + Deamidated (NQ)и hemoglobin subunit alpha (*LOC110259958*) + Lys->Allysine (K)	NP 001138313.1 XP 020942625.1	145/8/62 113/16/77	16,0/8,45	16,2/7,10 15,2/8,74
8	Смесь hemoglobin subunit beta (*HBB*)***(1) + Deamidated (NQ)и hemoglobin subunit alpha (*LOC110259958*)***(3) + Lys->Allysine (K)	NP 001138313.1 XP 020942625.1	200/10/75 127/15/97	16,0/8,50	16,2/7,10 15,2/8,74

Результаты идентификации белковых фракций комплексных экстрактов иммунных органов свиньи представлены в таблице 11.

Таблица 11 – Результаты масс-спектрометрической идентификации (MALDI-TOF MS и MS / MS) белковых фракций

№	Наименование белка; некоторые синонимы, (*символ гена*)	Номера в Protein NCBI	**S / M/ C** *	MW/pI (эксп.)**	MW/pI (расчет.)**
1	Transferrin (*TF*)	833800	143/27/39	77,0/7,80	77,0/6,73
2	Transferrin (*TF*)	833800	305/35/53	77,0/7,80	77,0/6,73
3	Rho GDP-dissociation inhibitor 1 (*ARHGDIA*)+ Acetyl (Protein N-term)	31940195	179/14/71	25,0/5,15	23,4/5,12
4	Rho GDP-dissociation inhibitor 2 (*ARHGDIB*)*	346716314	141/5/43	24,0/5,10	22,8/5,08
5	Cystatin-B (*CSTB*) + Acetyl (Protein N-term)	2494023	140/9/94	11,5/6,00	11,1/5,87
6	Гомолог fructose-bisphosphate aldolase A [Bos taurus] (*ALDOA*)	156120479	299/29/67	39,0/8,40	39,4/8,45
7	Phosphoglycerate kinase 1 (*PGK1*)	153792027	68/7/27	44,0/8,00	44,5/8,02
8	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*GAPDH*)	329744642	108/20/63	36,0/8,40	35,8/8,51
9	Malate dehydrogenase, mitochondrial (*MDH2*)	346421415	274/27/66	36,5/8,35	35,6/8,93
10	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*GAPDH*)	329744642	137/15/45	36,5/7,90	35,8/8,5
11	Flavin reductase (*NADPH*) (*BLVRB*) + Acetyl (Protein N-term)	335289705	177/11/42	22,0/8,00	22,2/6,35
12	Glutathione S-transferase P (*LOC100739163*)	927100908	193/20/61	22,5/7,40	23,7/7,66

13	Phosphoglycerate mutase 1 isoform 1 (*PGAM1*)	350592969	352/30/87	24,0/6,70	28,8/6,77
14	Rho GDP-dissociation inhibitor 2 (*ARHGDIB*)	346716314	140/12/49	19,0/6,30	22,8/5,08
15	Гомолог Ubiquitin [Camelus dromedarius и др.]	51701999	242/33/97	9,0/6,60	8,60/6,56
16	Albumin (*ALB*)	833798	113/9/20	69,0/6,10	69,4/5,92
17	Hemoglobin subunit beta (*HBB*) **** (1)	261245058	176/28/85	14,5/8,00	16,2/7,10
18	Serpin B9 (*SERPINB9*)	162139836	119/13/35	41,5/5,10	42,5/5,37
19	Гомолог proteasome subunit alpha type-5 [Leptonychotes weddellii] (*PSMA5*)*	58519750	150/8/31	28,0/4,65	25,6/4,65
20	Гомолог translationally-controlled tumor protein isoform 2 [Homo sapiens] (*TPT1*)	4507669	111/9/32	22,0/4,95	19,6/4,84
21	S-formylglutathione hydrolase (*ESD*)	47522936	176/12/62	30,5/7,70	31,5/6,54

При исследовании комплексных экстрактов иммунных органов на уровне спектра коротких пептидов выраженных сигналов отличий не было выявлено. Была построена аминокислотная последовательность и идентифицированы по два триптических пептида, присутствующих в спектрах коротких пептидов. По своей аминокислотной последовательности эти пептиды оказались фрагментами α-гемоглобина и α-тимозина (таблица 12).

Таблица 12. Результаты масс-спектрометрической идентификации (MALDI-TOF MS/MS) коротких пептидов (m/z 1500-5000) белковых фракций в комплесных экстрактах иммунных органов Sus scrofa.

№№	Наименование белка (*символ гена*)	Номера в Protein NCBI	m/z (позиция в а.п.)	а.п. пептида
1	hemoglobin subunit alpha (позиции 10-28) (*HBA*)	XP 020942625.1	2951.4 (позиции 10-28)	NVKAAWGKV GGQAGAHGAE
2	thymosin alpha (*PTMA*) + Acetyl (Protein N-term)	NP 001153558.1	3802.8 (позиции 15–31)	KDLKEKKEVV EEAENGR

Большой интерес представляет наличие в комплесных экстрактах пептида α-тимозина. Согласно международной базы данных Uniprot, данное соединение обозначено как C3VVV8_PIG, представлена только информация по выявлению его транскрипта. Данный белок играет важную роль в иммунном ответе, и он впервые обнаружен на уровне пептида в экстрактах иммунных органов свиньи. Также возможно провести корреляцию аминокислотной последовательности с существующим лекарственным препаратом тимозином а (тимальфазином, Задаксином®) - ацетилированным 28-аминокислотным полипептидом, который влияет на клетки иммунной системы, участвующие в противовирусном ответе, а также прямо воздействует на инфицированные вирусом гепатоциты.

Таким образом, протеомные исследования с последующей идентификацией отобранных белковых фракций позволили определить в смеси экстрактов на основе ВМИС наличие ряда тканеспецифичных белков: трансферринов, влияющих на кроветворение и скорость деление клеток, участвующих в

обеспечении врожденного иммунитета; ингибитора диссоциации Rho ГТ Фазы, ответственного за активацию кислорода супероксид-генерирующей НАДФ-оксидазы фагоцитов; цистатиан-Б, участвующий во внутриклеточном протеолизе; глютатион S-трансферразы, являющейся одним из важнейших факторов защиты от токсинов; фосфоглицерат-мутазы-В, активирующий адаптационные процессы организма; серпина В9, контролирующего процессы коагуляции и воспаления. В смеси экстрактов на основе ДВ данные соединения также идентифицированы, однако интенсивность пятен на электрофореграмме была значительно ниже.

Было показано наличие активных биомолекул в выбранном сырье, а также определена их сохранность при выбранных режимах получения комплексного экстракта. Показано, что при экстракции с использованием воды с модифицированным изотопным составом интенсивность выхода биомолекул увеличилась. 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.

3.2. Результаты биологических экспериментов по изучению эффективности и безопасности полученных БАВ

3.2.1 Результаты исследования БАВ in vitro и ex vivo

Исследование биологической активности *in vitro* (рисунок 11) показало, что экстракт на основе ВМИС способствует увеличению сохранности целостности биологической мембраны эритроцитов, в значительной степени ослабляя негативные последствия кислотного воздействия на живую клетку. Экстракт ВМИС обладает мембранотропной активностью, замедляя гемолиз до 30 секунд. Фракция экстракта Мм менее 30 кДа способствует увеличению сохранности целостности биологической мембраны эритроцитов в большей степени, чем комплексный экстракт. Уменьшается цитотоксическое действие и степень повреждения мембраны, что свидетельствует о большей биологической

доступности и активности фракции. Протективное действие данной фракции уменьшает скорость гемолиза до 60 секунд относительно контроля и до 30 секунд относительно экстракта.

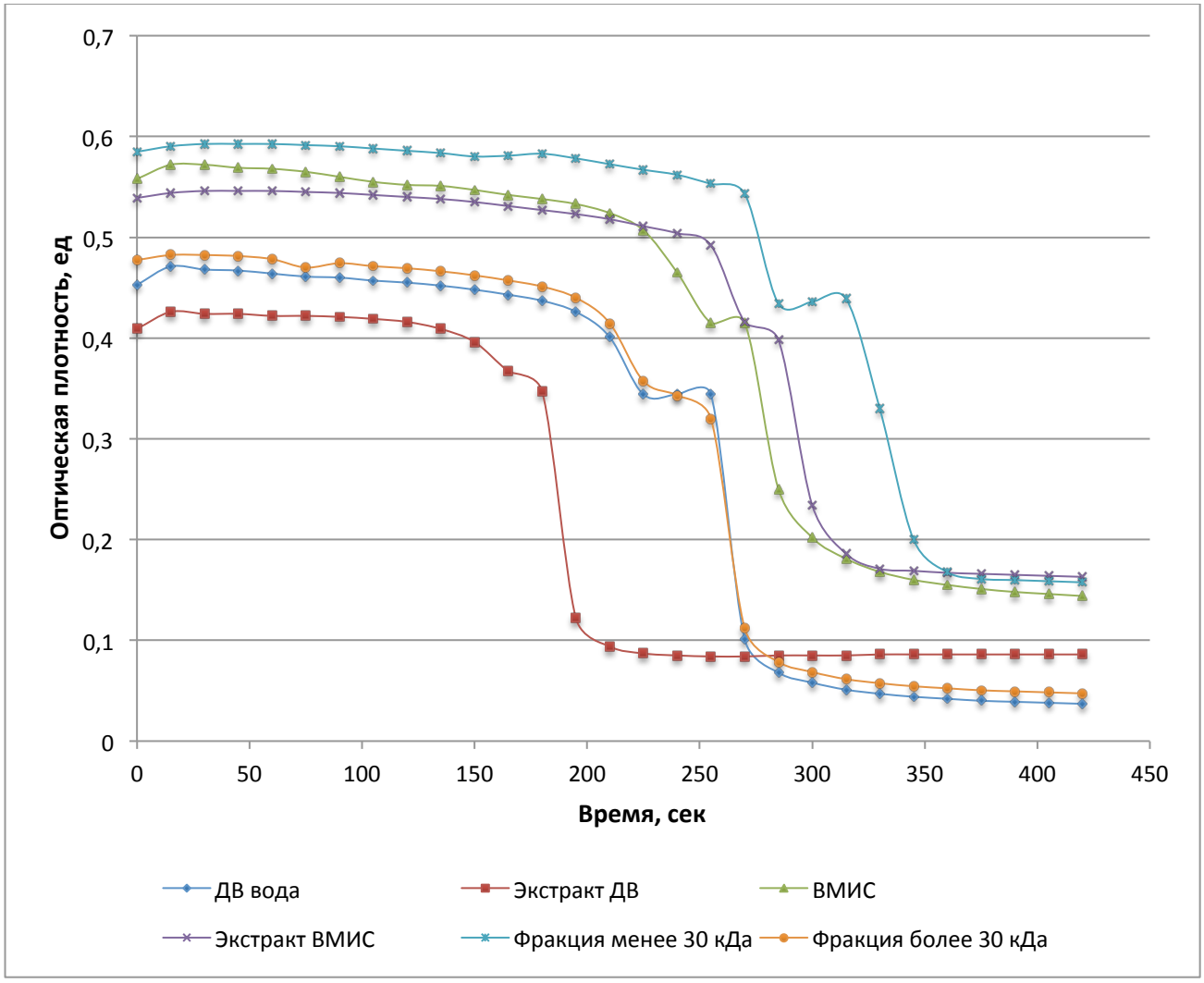


Рисунок 11 - Динамика изменения оптической плотности исследуемых образцов во времени (концентрация белка в экстрактах 500 нг/мл)

При исследовании ex vivo биологической активности комплексного экстракта ВМИС выявлена выраженная пролиферация клеток периферической зоны роста эксплантатов интимы аорты (на 16,6 %); слизистой оболочки желудка (на 13,4%), тимуса (на 21,9 %); печени (на 19,2 %) (рисунок 12). Также была показана высокая биологическая активность фракции экстракта Мм менее 30 кДа. Индекс роста площади составил 24,3 % для аорты, 14,2 % для слизистой оболочки желудка, 26,8 % для тимуса, 21,1 % для печени, что превышало показатели роста после добавления комплексного экстракта (17,0; 12,9; 22,0;

19,1 %, соответственно). Фракция более 30 кДа проявила исключительно ингибирующее действие.

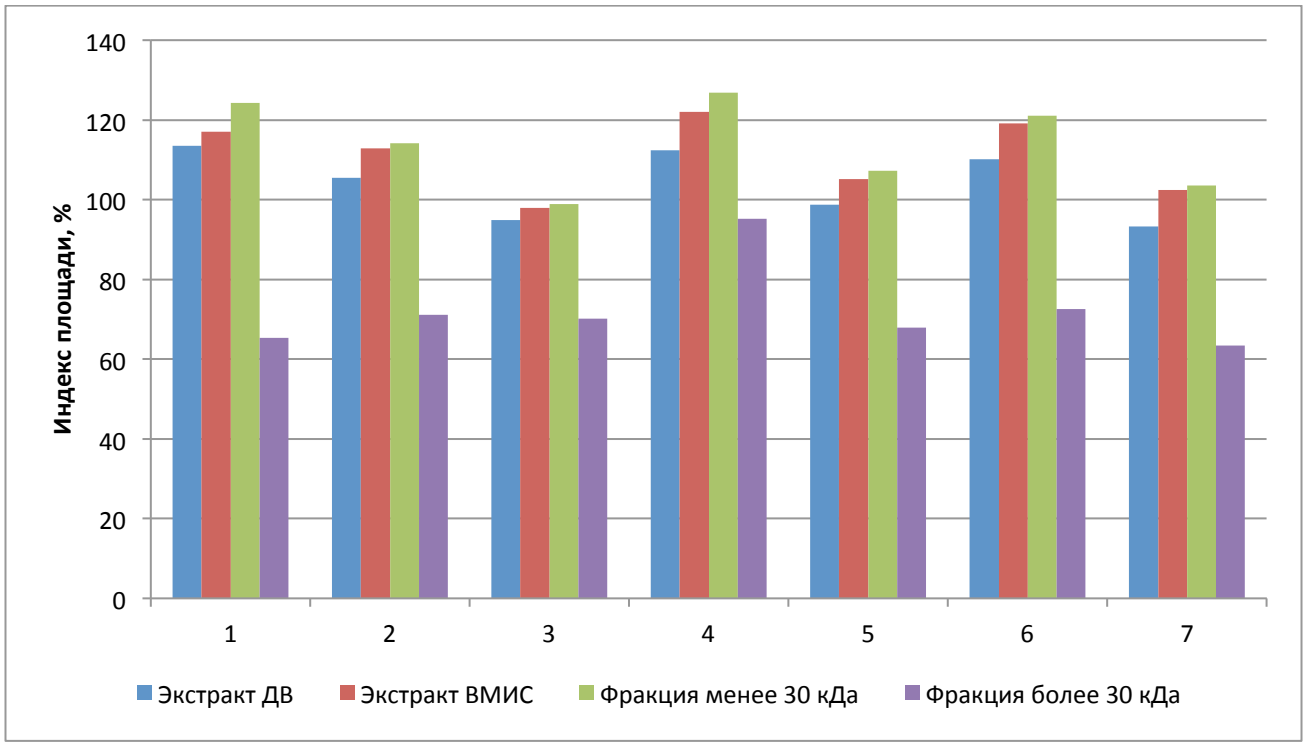


Рисунок 12 – Индекс площади роста эксплантатов при добавлении исследуемых образцов. Условные обозначения: 1 - аорта; 2 - слизистая оболочка желудка; 3 - двенадцатиперстная кишка; 4 - тимус; 5 - селезенка; 6 - печень; 7 - спинной мозг.

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 молекулярной массой менее 30 кДа, что подтверждается положительными результатами исследований in vitro и ex vivo.

3.2.2 Результаты исследования БАВ in vivo

Дальнейшие исследования были направлены на выявление биологических свойств комплексного экстракта и его фракций на модели иммунодефицита у крыс.

Было выявлено, что у животных опытных групп, в зависимости от исследуемых фракций экстракта, наблюдалась идентичная направленность изменения анализируемых показателей, различной степени выраженности, относительно контрольных животных 1-ой группы.

Цитометрический анализ (таблица 13) показал увеличение относительного содержания лимфоцитов и моноцитов (на 18 % и 27 %,) для группы 3 (комплексный экстракт); на 22 % и 31 % для группы 4 (фракция менее 30 кДа) и до 5% для группы 5 (фракция более 30 кДа), на фоне уменьшения процентного содержания гранулоцитов (свыше 20 % - у крыс групп 3 и 4; до 7 % - группы 5). Анализ фенотипирования лимфоцитов показал значительное увеличение по сравнению с контрольной группой 1 содержания клеток CD4: для группы 3 на 40,0%, для группы 4 на 40,3 % и для группы 5 на 4 %.

Таблица 13. Результаты цитометрического анализа крови лабораторных животных по завершении исследования

Относительное содержание	1 группа	2 группа	3 группа	4 группа	5 группа
лимфоцитов, %	49,67 ±2,61*	72,96 ±8,29	61,98 ±4,57**	60,55 ±4,24**	52,00 ±3,11
гранулоцитов, %	49,54 ±5,63*	25,63 ±8,67	36,97 ±7,17**	39,48 ±5,21**	46,12 ±4,78
моноцитов, %	0,84 ±0,05*	1,41 ±0,21	0,96 ±0,19**	1,09 ±0,21**	0,86 ±0,10
CD3, %	37,12 ±3,98	31,20 ±4,03	49,24 ±4,15**	46,25 ±3,57**	38,86 ±2,34
CD4, %	13,81 ±4,45*	27,15 ±2,94	23,12 ±3,42**	19,38 ±2,47**	14,33 ±1,77
Вндекс CD3/CD4	2,69±0,03	2,13±0,02	2,39±0,01	2,62±0,02	1,24±0,02
* - достоверное отличие от интактных крыс 2 группы (P<0,05). **- достоверное отличие от контрольных крыс 1 группы (P<0,05).					

Анализ иммуноферментных показателей сыворотки крови (таблица 14) выявил, что у животных 3 и 4 групп достоверно увеличивалось содержание IgG на 5 % и 16 % соответственно, IgM на 8 %, 24 %, соответственно; Il-2 и Il-6 в группах 3 и 4 возросло до 10 % относительно контрольной группы. Содержание Il-4 и ЦИК достоверно не изменялось в группах 3,4,5 по сравнению с показателями крыс 1 и 2 групп.

Таблица 14. 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).

Среди компонентов комплемента у крыс группы 3 по сравнению с контролем наблюдалось увеличение КК C1q до 10% и КК C4 до 13%, уменьшение содержания КК C5 до 6 % и C3 до 4%. Содержание КК в сыворотке у крыс 4-ой группы показало увеличение содержания КК C1q до 10 % на фоне увеличения количества КК C4 до 13 %. Кроме того, было отмечено уменьшение содержания КК C5 до 6 % и C3 до 4 %. Анализируемые показатели крыс 5-ой группы достоверно не отличались от значений контрольных крыс: данные находились в пределах погрешности, отличия не превышали 1,5 %.

В результате эксперимента установлено, что фракция комплексного экстракта с молекулярной массой менее 30 кДа обладала выраженной биологической активностью как на клеточном уровне, так и на уровне организма, характеризующейся восстановлением функциональной активности лейкоцитов крови, увеличением выработки цитокинов, в том числе интерлейкинов (Il-2 и Il-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.

Полученные результаты стали ключевыми для формирования комплекса методов оценки биологических свойств кормовой добавки. Разработанный комплекс основан на разносторонней оценке иммунореактивности биологически активных соединений в исследованиях in vitro и in vivo. Первым этапом исследований является оценка мембранотропной активности исследуемого объекта на модели кислотного гемолиза эритроцитов крови крысы – как результат, на графике кислотных эритрограмм возможно оценить цитопротективные свойства потенциального иммуномодулятора. Далее следует провести изучение органотропности биомолекул на эксплантатах тканей крыс с широкой выборкой тканей различного типа – изучаемые объекты способны активировать рост клеток органов согласно их функциям.

Завершающим этапом является оценка иммуностимулирующей активности in vivo на лабораторных крысах с моделью иммунодефицита. Особое внимание следует уделить выбираемым маркерам иммунитета, определяемым в крови и в сыворотке крови животных, в исследовании необходимо должным образом определить влияние исследуемого объекта как на компоненты Т и В системы, так и на цитокиновый профиль (интерлейкины). Кроме того, для понимания механизма действия биомолекул требуется определение концентрации компонентов комплемента.

Глава 4 Технологическая часть

4.1 Характеристика сырья и ингредиентов, используемых для производства кормовой добавки

1. Селезенки свиные замороженные по [ГОСТ 32244-2013, 2014], обезжиренные, промыты от крови и загрязнений, розоватого, красного, серого, синеватого цвета или с фиолетовым оттенков, замороженные в виде блоков или поштучно, температурой внутри толщи блока не выше минус 20°С.

2. Железы зобные (тимусы) свиные замороженные по [ГОСТ 21192-75, 1991], должны быть очищенные снаружи от наружного жира, прирезей, посторонних органов и тканей, заморожены блоками; поверхность блоков должна быть целая, твердая, укладка плотная, без пустот, без крупных кристаллов льда, цвет - бледно-серый, температурой внутри толщи блока не выше минус 20°С.

3. Мезентеральные лимфатические узлы свиньи замороженные, заморожены пластинами или блоками; поверхность без повреждений, целая, от бледно-желтого до бледно-розового цвета; внутри толщи блока температура не выше минус 18°С.

4. Соль поваренная пищевая, соответствующая [ГОСТ Р 51574-2018, 2018], степень помола № 0, 1, 2, на упаковке срок хранения до поступления в производство и дата выработки должны быть указаны, должны присутствовать данные о составе с учетом отсутствия дефектов упаковочных единиц. Должна представлять собой кристаллический сыпучий продукт белого цвета. Не допускается наличие посторонних механических примесей, не связанных с происхождением соли.

4. Вода с пониженным содержанием дейтерия представляет собой бесцветную прозрачную жидкость без посторонних примесей, без запаха и вкуса. Содержание дейтерия – D/H от 40 до 45 ppm.

5. Добавка пищевая натрия бензоат Е211 по [ГОСТ 32777-2014, 2015], представляет собой кристаллический порошок или гранулы белого цвета, однородный по всей массе, без запаха. Наличие посторонних механических примесей не допускается.

4.2 Технология производства кормовой добавки

Схема технологического процесса производства кормовой добавки для свиней представлена на рисунке 13.

Этап подготовки сырья включал очистку сырья: селезенки и тимуса – от сопутствующей ткани – внутреннего жира и капсулы; мезентеральных лимфатических узлов – от брыжеечного жира. Органы следует тщательно промыть.

После подготовки сырье с использованием ножа разделяли на куски 5х5 см и замораживали в морозильной камере при температуре минус 40°С. Сырье оставляли в морозильной камере не менее чем на 24 часа. После этого сырье подвергали разморозке при минус (4 – 5) °С. Следует отметить, что необходимо избегать смешивания органов различных наименований.

Затем подмороженное сырье измельчали с использованием мясорубки при низкой температуре для предотвращения изменения изначальной структуры белковых соединений.

Следующий этап включал экстракцию измельченного сырья. Экстракцию проводили 0,9 % раствором натрия хлорида на основе воды с пониженным содержанием дейтерия (40 ppm). Для экстракции использовалось соотношение сырье:экстрагент 1:5. Во время экстракции поддерживалась температура 4-5°С, скорость оборотов 400 об/мин. Экстракция длилась 75 мин для селезенки и МЛУ, 30 мин – для тимуса. По истечении этого времени для всех органов повышали скорость перешивания до 3000 об/мин в течение 3 мин.

После завершения процесса выделения биологически активных веществ полученные индивидуальные экстракты тканей иммунных органов отделяли от взвеси путем центрифугирования (скорость 12 000 об/мин, 5 мин) при температуре 4℃. Полученную надосадочную жидкость сливали для дальнейшего использования, осажденные частицы подлежали утилизации.

После отделения надосадочной жидкости полученные очищенные индивидуальные экстракты смешивали в соотношении 1:1:1 исходя из концентрации белка в экстрактах.

Полученный комплексный экстракт на следущем экстапе подлежал фракционированию методом ультрафильтрации с использованием установки Vivaflow 200 (Sartorius, Германия) с использованием специальных мембран (диаметр пор 30 кДа, давление 2,5 бар). В результате получали низкомолекулярный ультрафильтрат (с молекулярной массой менее 30 кДа), который подлежит дальнейшему использованию, и высокомолекулярный ультрафильтрат (с молекулярной массой более 30 кДа), который подлежит дальнейшей утилизации.

Для приготовления готовой формы кормовой добавки в низкомолекулярный ультрафильтрат (с молекулярной массой менее 30 кДа) добавляли специальный консервант - бензоата натрия Е-211– не более 0,2 %.

Полученную готовую форму кормовой добавки затем разливали в стеклянные бутыли объемом 0,5 л по ОСТ 6-09-108-85 из темного, бесцветного или зеленого стекла с плотной крышкой и прокладкой. Розлив готовой формы кормовой добавки проводился с использованием стерилизующего стерилизующего мембранного фильтра.

Были определены основные контрольные точки в технологии кормовой добавки.

КТ1 – контроль соответствия каждой партии иммунных органов свиньи: селезенки свиные замороженные - ГОСТ 32244, железы зобные (тимусы) свиные замороженные - ГОСТ 21192 (визуальный, химический).

КТ2 – контроль степени измельчения сырья (визуальный), проводится каждое измельчение.

КТ3 – контроль температуры в морозильной камере, исправность и надежность работы морозильной камеры перед каждой загрузкой (с использованием термометра).

КТ4 – контроль температуры при каждом размораживании (с использованием термометра).

КТ5 – контроль степени измельчения сырья (визуальный), проводится каждое измельчение.

КТ6 – контроль коммуникаций и оборудования: мешалок реакторов, центрифуги. Проверка исправности и надежности работы оборудования, соответствие требованиям инструкции по технике безопасности проводится перед каждой загрузкой. Контроль точности взвешивания сырья (физический), проводится каждое взвешивание. Контроль соответствия солюбилизирующего агента (содержание дейтерия – D/H от 40 до 45 ppm) химическим методом. Контроль объема солюбилизирующего агента (физический, мерной рейкой) при каждой экстракции; контроль концентрации соли в солюбилизирующем агенте (с использованием мерной емкости титрованием, при каждом приготовлении растворов). Контроль температуры при экстракции (при каждой загрузке, с использованием термометра). Контроль полноты экстракции (путем определения концентрации белка по завершении экстракции по биуретовому методу).

КТ7 – контроль степени продолжительности центрифугирования (визуально, до отсутствия выделения жидкости из остатков сырья) при каждой загрузке.

КТ8 – контроль коммуникаций и оборудования для проведения ультрафильтрации комплексного экстракта. Проверка исправности и надежности работы оборудования, соответствие требованиям инструкции по технике безопасности проводится перед каждой загрузкой. Контроль фракционирования комплексного экстракта (определение белка спектрофотометрическим методом).

КТ9 – контроль качества консерванта натрия бензоата Е211 - ГОСТ 32777 (химически). Контроль взвешивания (физически) для каждой патрии.

КТ10 – контроль активности кормовой добавки (биологические методы). Контроль качества маркировки (визуальный).

КТ11 – контроль условий хранения (физически, с использованием термометра).

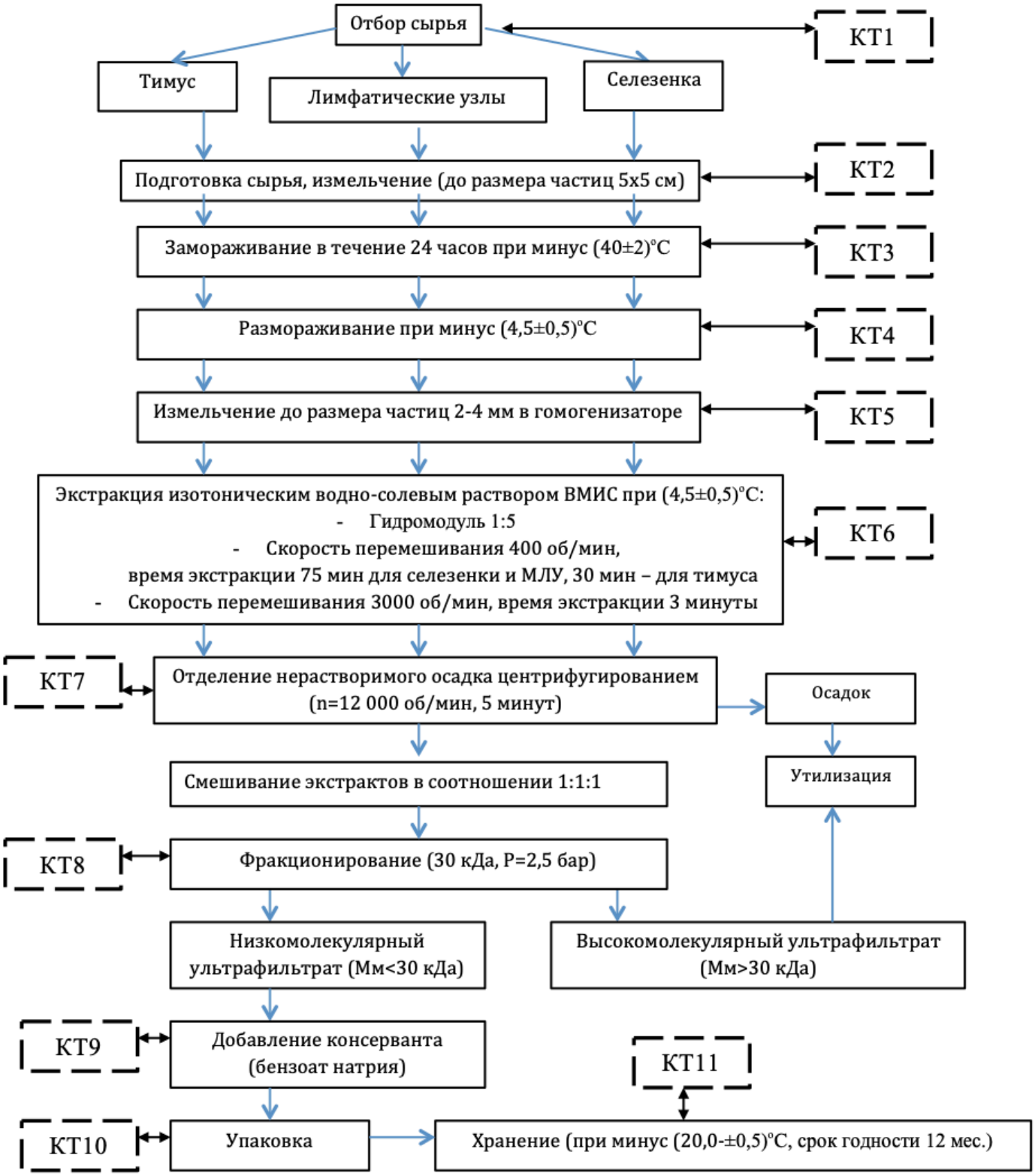


Рисунок 13 - Технологическая схема получения кормовой добавки

4.3 Результаты испытаний безопасности, стабильности и биологических свойств кормовой добавки

Для подтверждения безопасности и биологических свойств кормовую добавку подвергают соответствующим испытаниям.

Кормовая добавка в соответствии с «Едиными санитарно-эпидемиологическими и гигиеническими требованиями к товарам, подлежащим санитарно-эпидемиологическому надзору (контролю)» по показателям качества и безопасности должна соответствовать нормативным документам, которые указаны в таблице 15.

Таблица 15 - Показатели безопасности кормовых добавок

Наименование показателя	Нормативный документ
Содержание сульфитредуцирующих клостридий	ГОСТ 29185
Содержание БГКП (колиформы) в 1 г КД	ГОСТ 52816
Содержание КМАФАнМ	ГОСТ 10444.15
Содержание токсичных элементов:	
мышьяка	ГОСТ 26930
ртути	ГОСТ 53183
свинца и кадмия	МУК 4.1.986

Исследование стабильности готовой формы кормовой добавки с использованием специальных упаковочных материалов (бутыль стеклянная зеленая 500 мл с крышкой и прокладкой) и соответствующей этикетки проводили спустя 6 мес и 12 мес при соблюдении условий хранения в морозильной камере при температуре минус (20±2)°С путем измерения оптической плотности при 690 нм.

Динамика изменений характеристик готовой формы кормовой добавки (таблица 16) с течением времени свидетельствовали о стабильности свойств кормовой добавки в течение 6 месяцев. Показано наличие незначительных отклонений, системных изменений в значениях Abs не выявлено.

Результаты исследования оптической плотности кормовой добавки через 12 месяцев показали снижение оптической плотности и концентрации белка до 4,5 %.

Таблица 16 – Результаты исследования стабильности кормовой добавки при хранении

Показатели	Срок хранения		
	0 мес	6 мес	12 мес
Оптическая плотность, Abs	0,3109	0,3082	0,2972
Концентрация белка, г/100 мл	5,08	5,04	4,84

Результаты изучения биологических свойств кормовой добавки путем сравнительного анализа готовой формы и фракции экстракта MW менее 30 кДа в исследованиях in vitro на куриных эксплантатах показали сохранение биологической активности. Кормовая добавка достоверно увеличивает пролиферацию клеток сосудистой стенки (на 24,4 %); энтероцитов (на 15,5%), тимоцитов (на 28,1 %); гепатоцитов (на 21,1 %); повышает резистентность мембраны эритроцита на 65 секунд относительно контроля.

Дополнительно проведенный тест розеткообразования на тимоцитах морской свинки (РОК) показал, что готовая форма обладает тимической активностью в равной степени с фракцией комплексного экстракта с молекулярной массой менее 30 кДа. Исследуемые образцы при снижении среднеарифметического числа розеткообразующих клеток при повреждении мембран трипсином по сравнению с нормой, восстанавливали количество РОК более чем в 60% случаев не менее чем на 40% по сравнению с контролем.

Исследования in vivo показали, что использование готовой формы способствует увеличению содержания CD3 и CD4 (на 24 % и 40%), IgG и IgM (на 16 % и 10 %), Il-2 и Il-6 (до 10 %), компонентов комплемента (C1q до 10% и C4 до 13%), что подтверждает сохранение активности биологических функциональных компонентов. Полученные данные коррелируют с данными, полученными при изучении фракции комплексного экстракта с молекулярной массой менее 30 кДа.

Проведенный сравнительный анализ активности готовой формы кормовой добавки после хранения в течение 6 мес и 12 мес методом розеткообразования показал, что кормовая добавка в процессе хранения сохраняет активность. Исследуемые образцы после хранения в течение 6 мес восстанавливали

количество РОК не менее чем на 40 % по сравнению с контролем более чем в 60 % случаев. После хранения кормовой добавки в течение 12 мес активность биологических соединений снизилась – отмечено восстановление РОК не менее чем на 40 % относительно контроля в 50 % случаев.

Результаты изучения острой пероральной токсичности на лабораторных грызунах показали, что при однократном внутрижелудочном введении кормовая добавка обладает малотоксичным действием. Предельная доза технологической добавки (2000 мг/кг, 1 этап), составила для крысы №1, массой 151,7 г – 303,4 мг; крысы №2, массой 165,0 г – 330,0 мг; крысы №3, массой 155,9 г – 310,4 мг.

Данные дозы при внутрижелудочном введении не вызывали признаки неблагополучия животных как сразу после введения, так и на протяжении периода наблюдения – 14 суток. Не было также отмечено иных признаков интоксикации: сердечная деятельность, двигательная активность, дыхательная активность, реакция на внешние раздражители без отклонений. Крысы на протяжении всего периода эксперимента увеличивали массу тела (в среднем на 1,03 г в сутки). Изменения массы представлены в таблице 17.

Таблица 17 – Динамика изменения массы животных после введения кормовой добавки в дозе 2000 мг/кг (1 этап)

Идентификационный номер животного	До введения	Сутки наблюдения			
		3-и	7-е	10-е	14-е
1	151,7	155,1	163,4	166,8	167,4
2	165,0	167,4	171,2	179,1	182,7
3	155,2	157,1	161,5	162,1	164,9

При проведении второго этапа исследований – введении животным технологической добавки в дозе 2000 мг/кг (2 этап), составившей для крысы №1, массой 150,7 г – 301,4 мг; крысы №2, массой 158,1 г – 316,2 мг; крысы №3, массой 160,4 г – 320,8 мг, также не было выявлено каких-либо токсических эффектов – отклонений в состоянии животных не наблюдалось на всем периоде наблюдения. Все животные стабильно набирали массу на протяжении всего

исследования (в среднем на 1,07 г в сутки). Динамика изменения массы представлена в таблице 18.

Таблица 18 - Динамика изменения массы животных после введения кормовой добавки в дозе 2000 мг/кг (2 этап)

Идентификационный номер животного	До введения	Сутки наблюдения			
		3-и	7-е	10-е	14-е
1	150,7	162,9	162,2	170,2	168,4
2	158,1	161,0	163,7	169,4	170,1
3	160,4	161,8	166,4	172,6	175,5

Результаты аутопсии и макроскопическое исследование изучаемых органов крыс не показали различий между животными, получившими разные дозы препарата.

Внешний осмотр показал, что шерсть животных была гладкой, опрятной блестящей, с отсутствием аллопеций и выделений из естественных отверстий. Передние и задние конечности крысы находились без изменений. Слизистые оболочки (видимые) быи бледными, блестящими и гладкими. Все зубы у крысы сохранены. Осмотр грудной полости и полости брюшины не показал нарушений в положении внутренних органов, перикард, листки плевры и брюшины гладкие и тонкие, заметно блестящие. Слюнные железы и лимфатические узлы были без изменений, отмечено, что они были овальной и округлой формы, цвета однородного, розоватого, умеренная плотность. Тимус крыс был беловатого цвета слоновой кости, умеренно плотный, без очагов размягчений. Сердце и аорта в грудной клетке без патологии. При вскрытии грудной клетки легкие спались, величина и форма легких не изменены, поверхность однородная, гладкая, блестящая, бледно-розового цвета. Пищевод и его слизистая оболочка блестящая, гладкая, бледного цвета. Желудок по форме и размеру не изменен, слизистая желудка – блестящая, гладкая, розоватая, без признаков раздражающего действия, желудок заполнен содержимым. Тонкая, толстая и двенадцатиперстная кишки без изменений, слизистые блестящие, гладкие, бледно-розоватые с сероватым оттенком. Печень по форме и величине не

изменене, капсула печени тонкая, прозрачная, поверхность - гладкая, однородная. темно-красного цвета. Поджелудочная железа без патологии, дольчатая по строению, бледно-розового цвета, умеренно плотная. Селезенка по размеру и форме без патологии, однородная поверхность, темно-вишневого цвета, гладкая, плотная умеренно. Почки также без патологии, поверхность их гладкая, однородного серовато-коричневатого цвета, умеренно-плотной констистенции, на разрезе почки хорошо различимо корковое и мозговое вещество. Мочевой пузырь без изменений, заполненный прозрачной мочой светло-желтого цвета, слизистая оболочка мочевого пузыря бледноватой окраски, гладкая, блестящая. Без изменений форма, плотность и размеры яичников. Оболочки у головного мозга прозрачные, тонкие, без патологий - умеренная плотность, гладкая поверхность, расширения желудочков не выявлено. Относительные массы внутренних органов не показали значимых изменений (Таблица 19).

Таблица 19 – Относительная масса внутренних органов крыс

№ жив-го	Тимус	Сердце	Легкие	Селезенка	Надпо чечник	Почка	Печень	Яичник	Матка	мозг
Доза кормовой добавки 2000 мг/кг (♀, 1 этап)										
1	0,266	0,410	0,706	0,200	0,021	0,350	3,148	0,034	0,301	1,035
2	0,318	0,351	0,783	0,206	0,022	0,326	2,936	0,036	0,234	0,869
3	0,285	0,396	0,968	0,247	0,025	0,431	3,750	0,035	0,323	1,049
Доза кормовой добавки 2000 мг/кг (♀, 2 этап)										
1	0,361	0,347	1,005	0,360	0,027	0,455	4,186	0,038	0,242	1,007
2	0,286	0,319	0,738	0,264	0,025	0,417	4,054	0,040	0,203	1,026
3	0,223	0,324	0,702	0,206	0,025	0,365	2,990	0,034	0,170	0,839

На основе проведенного эксперимента кормовую добавку в соответствии ГОСТ 32644 можно отнести к 5 классу в опасности. В соответствии с ГОСТ 12.1.007 –к веществам малоопасным IV класса опасности.

Затем были проведены исследования острого раздражающего действия кормовой добавки. Кормовая добавка рассматривалась нами как не обладающий разъедающей (коррозийной) или раздражающей способностью, в связи с чем

первое исследование проводили на одном животном, подтверждающий на трех. При однократной аппликации кормовой добавки через 60 минут и через 24 часа после удаления испытуемого вещества на месте наложения пробы признаков раздражения кожного покрова не выявлено (таблица 20). Среди соматических реакций выявлены повышенная возбудимость и тревога в момент нанесения испытуемого вещества. Изменений клинических признаков не наблюдалось – кролики на протяжении эксперимента были подвижны и активны; мышцы в тонусе; тактильная реакция сохранена; видимые слизистые оболочки бледно-розового цвета, истечений и других признаков воспалительных реакций нет.

Таблица 20 – Выраженность местно-раздражающего действия кормовой добавки при однократной аппликации на кожу

Время экспозиции, час	Толщина кожной складки, мм	Выраженность отека	Эритема	Уровень классификации (суммарный)
1	4,6	Отсутствует	Отсутствует	0
24	4,5	Отсутствует	Отсутствует	0
48	4,5	Отсутствует	Отсутствует	0
72	4,5	Отсутствует	Отсутствует	0

Таким образом, кормовую добавку в данных концентрациях можно отнести к 4 классу опасности.

Далее были проведены исследования сенсибилизирующего действия кормовой добавки. Первое тестирование проводили через 21 час после удаления герметичной повязки, результаты которого показали отсутствие признаков сенсибилизации животных к технологической добавке «Тринатрий пирофосфат» в концентрации 12%. Никаких видимых изменений согласно шкале Магнуссона - Клигмана (эритемы, отека, расчесов, утолщения кожной складки) отмечено не было. Также не наблюдалось изменения соматических реакций в сравнении с контрольной группой – морские свинки были подвижны и активны; мышцы в тонусе; тактильная реакция сохранена; видимые слизистые оболочки бледно-розового цвета, истечений и других признаков воспалительных реакций нет.

Повторное тестирование через 48, 72 часа после удаления герметичной повязки дали аналогичные результаты.

Таким образом, полученные данные дают возможность утверждать, что кормовая добавка в данных условиях и на данном виде животных не обладает сенсибилизирующим действием на кожный покров.

Согласно ГОСТ 32644 кормовую добавку можно отнести к 5 классу в СГС. Согласно ГОСТ 12.1.007 – к IV классу опасности – веществам малоопасным. 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.

4.4 Характеристика конечной продукции производства

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 5,0 %, 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.

Готовую кормовую добавку фасуют в бутыли по ОСТ 6-09-108-85 из темного или бесцветного стекла, объемом 0,5 л (500 мл).

Для местной реализации допускается упаковка бутылей с кормовой добавкой в ящики из гофрированного картона No 10, No 12, No 13, No 16, No 24 по ГОСТ 13511, заклеенные клеевой лентой и выстланные внутри оберточной бумагой.

На каждой упаковочной единице должна быть этикетка в соответствии с ТР ТС 022/2011 и ГОСТ Р 51074 в виде печати на пленке или из этикеточной бумаги в соответствии с ГОСТ 7625 или писчей по ГОСТ 18510, с указанием местонахождения и наименования изготовителя (юридический адрес, включая страну, и, при несовпадении с юридическим адресом, адрес(а) производств(а)),

товарного знака (при его наличии), наименования продукта и его активности, даты изготовления, номера партии, состава продукта, условий хранения, срока годности, массы нетто (кг), информации о подтверждении соответствия, обозначения нормативного документа.

Кормовую добавку следует транспортировать всеми видами транспорта, с использованием крытых транспортных средств в соответствии с правилами перевозки грузов, действительными для соответствующих видов транспорта, в упакованном виде по ГОСТ 24597, ГОСТ 26663. Кормовую добавку должны сопровождать ветеринарные сопроводительные документы, предусмотренные действующими «Правилами организации работы по выдаче ветеринарных сопроводительных документов» при температуре от 0°С до 20 °С и относительной влажности воздуха не более 75 %.

Хранение кормовой добавки во избежание производится при температуре минус (20±0,5)^{o}С и относительной влажности (75 ± 5) %. Срок годности кормовой добавки 6 месяцев со дня выработки.

4.5 Расчет себестоимости производства кормовой добавки из иммунных органов свиней

Расчет себестоимости производства кормовой биологической добавки был проведен на основании «Методических указаний по учету затрат и калькулированию себестоимости мяса и мясных продуктов» (ВНИИМП, 2010).

Определены цены на используемое сырье с использованием коэффициентов потребительной стоимости в соответствии с соотношением цен на мясо на костях («Справочник показателей потребительских свойств мяса и мясных продуктов», ВНИИМП, 2006). Коэффициенты потребительной стоимости на сырье составили: свинина – 1; селезенка – 0,1; тимус – 0,8; мезентеральные лимфатические узлы – 0,25.

По данным Росстата за март 2019 года, средняя цена на свинину (цена производства) составила– 180,0 руб. за 1 кг с НДС. Стоимость свинины (1 кг) без НДС –150,00 руб.

В расчетах принимаются цены на сырье, используемое в производстве кормовой добавки, в соответствии с коэффициентами потребительной стоимости:

- селезенка – 0,1 – 150*0,1=15 руб/кг;

- тимус (вилочковая железа) – 0,8 – 150*0,8=120 руб/кг;

- мезентеральные (брыжеечные) лимфатические узлы – 0,25 – 150*0,25=37,5 руб/кг.

Расчёт стоимости основной сырьевой составляющей кормовой добавки приведен в таблице 21.

Таблица 21 – Расчет стоимости сырья для производства кормовой добавки

Статьи затрат	Ед.изм.	Расход на 100 литров, кг	Цена, ед. руб.	Стоимость на 100 литров, руб.
Селезенка	кг	5,75	15,00	86,25
Тимус	кг	8,00	120,00	960,00
Мезентеральные лимфатические узлы	кг	7,35	37,50	275,63
Итого сырье и основные материалы				**1 321,88**

При дальнейших расчетах была также определена стоимость вспомогательных и упаковочных материалов для производства кормовой добавки (таблица 22).

Таблица 22 – Расчет стоимости вспомогательных и упаковочных материалов

Статьи затрат	Ед. изм.	Расход на 100 литров, кг	Цена, ед.руб.	Стоимость на 100 литров, руб.
Вспомогательные материалы на технологические цели:				
Соль поваренная	кг	1,14	7,50	8,55
Бензоат натрия (Е-211)	кг	0,20	112,00	22,40
Вода (D/H=40 ppm)	кг	126,80	334,00	42 351,20
Упаковочные материалы:				

Бутыль стеклянная	шт	200	27,00	5 500,00
Этикетки	шт	200	2,80	560,00
Итого вспомогательные и упаковочные материалы				**48 442,15**

Следующим этапом стал расчет затрат на оплату труда производственных рабочих и учет цеховых и общезаводских затрат (таблица 23).

Таблица 23 – Расчет затрат на оплату труда производственных рабочих и накладные расходы

Статьи затрат	Ед. изм.	Расход на 100 литров, час	Цена (1 час) ед.руб.	Затраты на 100 литров, руб.
Затраты на оплату труда производственных рабочих	час	4,63	538,00	**2 491,00**
Цеховые и общезаводские затраты	х	х	-	**12 454, 97**

В таблице 24 приведена сводная калькуляция себестоимости кормовой добавки, включающая расходы на топливо и энергию на технологические цели (калькуляционная единица – 100 литров).

Таблица 24 – Калькуляция себестоимости кормовой добавки из иммунных органов свиней

Статьи затрат	Ед. изм.	Расход на 100 литров, кг	Цена, ед.руб.	Стоимость на 100 литров, руб.
Селезенка	кг	5,75	15,00	86,25
Тимус	кг	8,00	120,00	960,00
Мезентеральные лимфатические узлы	кг	7,35	37,50	275,63
Итого сырье и основные материалы				**1 321,88**
Вспомогательные материалы на технологические цели:				
Соль поваренная	кг	1,14	7,50	8,55
Бензоат натрия (Е-211)	кг	0,20	112,00	22,40
Вода (D/H=40 ppm)	кг	126,80	334,00	42 351,20
Упаковочные материалы:				
Бутыль стеклянная	шт	200	27,00	5 500,00

Этикетки	шт	200	2,80	560,00
Итого вспомогательные и упаковочные материалы				**48 442,15**
Затраты на оплату труда производственных рабочих	час	4,63	538,00	**2 491,00**
Цеховые и общезаводские затраты	х	х	-	**12 454, 97**
Топливо и энергия на технологические цели	х	х	-	**1 980,00**
Производственная себестоимость	х	х	-	66 690,00
Прибыль	х	х	-	3 310,00
Оптовая цена	х	х	-	70 000,00

Таким образом, оптовая стоимость 100 литров кормовой добавки для свиней составляет 70 000 рублей. Себестоимость производства кормовой добавки на основе биологически активных веществ животного происхождения составляет 350 руб на 0,5 литра.

Заключение

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 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 MW менее 30 кДа. Разработан комплекс методов оценки биологических свойств кормовой добавки на основе БАВ.

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.

Список использованной литературы

1. Акимова Е.И. Методы количественного определения белка: Учебное пособие/ Е. И. Акимова ; ред.: В. Ф. Травень, В. В. Асеев. - М.:РХТУ им. Д.И. Менделееваю -2009. - 88 с.

2. Вострикова Н.Л., Чернуха И.М. Биоинформатика — инструмент интерпретации протеомных профилей белков мяса // Теория и практика переработки мяса. - 2017. - N 1, Т. 2. - С. 4-17.

3. ГОСТ 21192-75. Железы зобные замороженные. Технические условия. – 1991. М: Государственный комитет СССР по стандартам. – 7 с.

4. ГОСТ 23042-15. Мясо и мясные продукты. Методы определения жира. – 2016. - М.: Стандартинформ. – 12 с.

5. ГОСТ 25011-2017. Мясо и мясные продукты. Методы определения белка. – 2018. – М.: Стандартинформ. – 14 с.

6. ГОСТ 31727-2012. Мясо и мясные продукты. Метод определения массовой доли общей золью – 2013. - М.: Стандартинформ. – 8 с.

7. ГОСТ 32244-2013. Субпродукты мясные обработанные. Технические условия 2014. – М.: Стандартинформ. – 13 с.

8. ГОСТ 32375-2013. Методы испытания по воздействию химической продукции на организм человека. Испытания по оценке кожной сенсибилизации. – 2014. - М.: Стандартинформ. – 7 с.

9. ГОСТ 32436-2013. Методы испытания по воздействию химической продукции на организм человека. Испытания по оценке острого раздражающего/разъедающего (коррозионного) действия на кожу – 2014. - М.: Стандартинформ. – 15 с.

10. ГОСТ 32644-2014. Методы испытания по воздействию химической продукции на организм человека. Острая пероральная токсичность - метод определения класса острой токсичности. – 2015. - М.: Стандартинформ. – 12 с.

11. ГОСТ 32777-2014. Добавки пищевые. Натрия бензоат Е211. Технические условия. – 2015. - М.: Стандартинформ. – 18 с.

12. ГОСТ Р 51574-2018. Соль пищевая. Общие технические условия. – 2018. - М.: Стандартинформ. – 8 с.

13. Заико, М. В. История и перспективы медицинского применения сырья животного происхождения на примере органопрепаратов из селезенки свиньи / М. В. Заико, С. В. Козин, Л. А. Павлова // Традиционная медицина. – 2014. – Т.1 (36). – С. 42 – 48.

14. Зарецкая Ю. М. Клиническая иммуногенетика/ Ю. М. Зарецкая. - М. : Медицина, 1983. - 208 с.

15. Кашинова Э.Б. Оптимизация технологических режимов выделения биологически активных веществ из сырья животного происхождения / Э.Б. Кашинова, Е.А. Котенкова, Е.А. Ертикеева, А.Г. Ахремко // Актуальная биотехнология. – 2016. – №.1 (16). – с. 17–22.]

16. Конки Д. Культура животных клеток. Методы / Д. Конки, Э. Эрба, Р. Фрешни, Б. Гриффитс. – М.: Мир. – 1989. – 333 с.

17. Котенкова Е.А. Изучение антимикробных свойств биологически активных веществ животного происхождения в зависимости от методологии их выделения/ Е.А. Лукинова, Е.А. Котенкова, Е.К. Полищук// Теория и практика переработки мяса. - 2018. - Т. 3. № 3. - С. 27-35.

18. Котенкова Е.А. Оптимизация методов экстракции для выделения максимального количества тканеспецифических биологически активных веществ, обладающих гиполипидемическим и антиатеросклеротическим действиями/ Е.А. Котенкова, А.Г.Ахремко // Материалы Международной научно-практической конференции «Новые подходы, принципы и механизмы повышения эффективности производства и переработки сельскохозяйственной продукции».- Волгоград. – 2014. – 155-157 с.

19. Кузнецова Д.П. Новый биорегулятор из поджелудочной железы крупного рогатого скота / Д. П. Кузнецова, Б. Б. Березин, А. П. Ильина и др. // Фундаментальные исследования. – 2015. – № № 2-14. – С. 3079-3084.

20. Лопатина Е. В. Исследование участия Na/K–АТФазы в регуляции роста эксплантатов ткани сердца в органотипической культуре / Е.В. Лопатина,

В.А. Пенниайнен, А.А. Зайка // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2005. – Т.140, No 8. – С.150–152.

21. Лопатина Е. В. Исследование участия Na/K–АТФазы в регуляции роста эксплантатов ткани сердца в органотипической культуре / Е.В. Лопатина, В.А. Пенниайнен, А.А. Зайка // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2005. – Т.140, No 8. – С.150–152.

22. Лопина О. Д. Основы биохимии. Статическая биохимия: Учебное пособие/ О. Д. Лопина, А.Е. Щекотихин, Е.И. Акимова, А.В. Панов // М.:РХТУ им. Д.И. Менделеева. – 2013. – 172 с.

23. Мальчевский В.А. Способ извлечения куриного эмбриона из яйца для дальнейшего получения клеточных трансплантатов из фетальных тканей: пат. 2538701 Рос. Федерация: МПК 51 А 61 К 35/12 / В.А. Мальчевский, С.А. Петров; заявитель и патентообладатель ТюмНЦ СО РАН . – No 2013132327/15; заявл. 11.07.2013; опубл. 10.01.2015 Бюл. No 1

24. Россельхознадзор [электронный ресурс]. – 2018. – Дата обращения: 15.10.2018. URL: https://www.fsvps.ru/fsvps/iac/

25. Салова Т.Ю., Громова Н.Ю. Теоретические аспекты получения биологически активных веществ из растительного и животного сырья // Успехи современного естествознания. – 2016. – №3. – С. 39–43.

26. Сыровая А.О. Аминокислоты глазами химиков, фармацевтов, биологов: в 2-х т. Том 1 / А.О. Сыровая, Л.Г. Шаповал, В.А. Макаров, В.Н. Петюнина и др. // − Х. «Щедра садиба плюс», 2014 – 228 с.

27. Уилсон К. Принципы и методы биохимии и молекулярной биологии/ ред. К. Уилсон, Дж. Уолкер // пер. с англ. — 2-е изд. — М.: БИНОМ. Лаборатория знаний. – 2015. – 698-704 с.

28. Хаитов, Р. М. Основные принципы иммуномодулирующей терапии / Р. М. Хаитов, Б. В. Пинегин // Аллергия, астма и клиническая иммунология. – 2000. – Т. 4, No 1. – С. 9 – 16.

29. Хисматуллина З. Н. Методы фракционирования смеси белков на индивидуальные белки/ З. Н. Хисматуллина // Вестник Казанского технологического университета. – 2013. - №21.

30. Цуркан М.В. Воздействие терагерцового излучения на рост нейритов / М.В. Цуркан, О.А. Смолянская, Н.Г. Брянцева // Научно-технический вестник информационных технологий, механики и оптики. – 2013. – No 1(83). – С. 60-64.

31. Al-Wahaibi L. H. Adamantane-Isothiourea Hybrid Derivatives: Synthesis, Characterization, In Vitro Antimicrobial, and In Vivo Hypoglycemic Activities/ L. H. Al-Wahaibi, H. M. Hassan, A. M. Abo-Kamar, et al.// Molecules. – 2017. – V.22(5). – P. 710.

32. Ambrogini E. Oxidation-specific epitopes restrain bone formation/ E. Ambrogini, X. Que, S. Wang, F. Yamaguchi, et al // Nature Communications. – 2017. - V. 9, I. 1. - №2193.

33. Argüello H. Surveillance Data Highlights Feed Form, Biosecurity, and Disease Control as Significant Factors Associated with Salmonella Infection on Farrow-to-Finish Pig Farms/ H. Argüello, E.G. Manzanilla, H. Lynch, K. Walia et al.//. Front Microbiol. – 2018. – V. 9. – P. 187.

34. Arshad M.S. Ruminant meat flavor influenced by different factors with special reference to fatty acids/ M.S. Arshad, M. Sohaib, R.S. Ahmad, M.T. Nadeem et al.// Lipids Health Dis. – 2018. – V. 17(1). – P. 223.

35. Ascough S. Induction and Subversion of Human Protective Immunity: Contrasting Influenza and Respiratory Syncytial Virus/ S. Ascough, S. Paterson, C. Chiu// Frontal Immunology. – 2018. – V. 9. – P. 323.

36. Avila, D. S., Somlyai, G., Somlyai, I., & Aschner, M. (2012). Anti-aging effects of deuterium depletion on Mn-induced toxicity in a C. elegans model. Toxicology letters, 211(3), 319–324. doi:10.1016/j.toxlet.2012.04.014

37. Bagheri G. Cytotoxic and antioxidant activities of alstonia scholaris, alstonia venenata and moringa oleifera plants from India / G. Bagheri, M. Mirzaei, R.

Mehrabi, J. Sharifi-Rad// Jundishapur Journal of Natural Pharmaceutical Products. – 2016. – V. 11(3). – P. e31129.

38. Baradaran M. A novel defensin-like peptide associated with two other new cationic antimicrobial peptides in transcriptome of the Iranian Scorpion Venom/ M. Baradaran, A. Jalali, M.N. Soorki, H. Galehdari// Iranian Biomedical Journal. – 2017. – V. 21, I. 3. – P. 190-196.

39. Bastani P. The mechanisms of immune system regulation by probiotics in immune-related diseases / P. Bastani, A. Homayouni, L. Norouzi-Panahi, A. Tondhoush, et al// Journal of Pharmacy and Nutrition Sciences. – 2016. – V. 6, I. 3. – P. 105-111.

40. Bastin C. On the role of mid-infrared predicted phenotypes in fertility and health dairy breeding programs/ C. Bastin, L. Théron, A. Lainé, N. Gengler// Journal of Dairy Science. – 2016. – V. 99(5). – P. 4080-4094.

41. Brady P.N. Evaluation of Colorimetric Assays for Analyzing Reductively Methylated Proteins: Biases and Mechanistic Insights / P.N. Brady, M.A. Macnaughtan // Analytical biochemistry.— 2015. — V.491. — P. 43–51.

42. Burny W. Different Adjuvants Induce Common Innate Pathways That Are Associated with Enhanced Adaptive Responses against a Model Antigen in Humans/ W. Burny, A. Callegaro, V. Bechtold, F. Clement, et al.// Frontal Immunology. – 2017. – V. 8. – V. 943.

43. Caspar Y. Francisella tularensis Susceptibility to Antibiotics: A Comprehensive Review of the Data Obtained In vitro and in Animal Models/ Y. Caspar, M. Maurin// Front Cell Infection Microbiology. – 2017. – V. 7. – P. 122.

44. Chattopadhyay M.K. Use of antibiotics as feed additives: a burning question/M.K. Chattopadhyay//Front. Microbiol. - 2014. - Vol. 5. – 334.

45. Chen D. Study of the adoptive immunotherapy on rheumatoid arthritis with Thymus-derived invariant natural killer T cells/ D. Chen, H. Liu, Y. Wang, S. Chen// Int Immunopharmacol. – 2019. – V.67. – P. 427-440.

46. Cheng D. Dietary Chlorella vulgaris Ameliorates Altered Immunomodulatory Functions in Cyclophosphamide-Induced Immunosuppressive Mice/ D. Cheng, Z. Wang, X. Zhang, J. Li// Nutrients. – 2017. – V. 9(7). – P. 708.

47. Chernukha I.M. Influence of heat treatment on tissue specific proteins in the cardiac muscle and aorta sus scrofa/ I.M. Chernukha, L.V. Fedulova, E.A. Kotenkova, S.S. Shishkin, et al// Russian Journal of Biopharmaceuticals. – 2016. – V. 8, № 6. – P. 38-44.

48. Choi K.T. Botanical characteristics, pharmacological effects and medicinal components of Korean Panax ginseng C A Meyer/ Acta Pharmacol Sin. – 2008. – V.29. – P.1109–1118.

49. Cong F. S. Deuterium-depleted water inhibits human lung carcinoma cell growth by apoptosis / F. S. Cong, Y. R. Zhang, H. C. Sheng, Z. H. Ao et al.// Experimental and therapeutic medicine. – 2010. – V. 1(2). – P. 277–283.

50. Cordwell S.J. Cross-sepcies indetification of proteins separated by two-dimetional electrophoresis using matrix-assisted laser desorption time of flight mass spectrometry and amino acid composition/ S.J. Cordwell, M.R. Wilkins, A. Cerpa-Poljak, et al. // Electrophoresis. - 1995. - Vol. 16. - P. 438-443.

51. Cottingim K.M. Feed additives decrease survival of delta coronavirus in nursery pig diets./ K.M.Cottingim, H. Verma, P.E. Urriola, F. Sampedro et al.// Porcine Health Manag. – 2017. – V. 20. – P. 3-5.

52. Cronkite D.A. The Regulation of Inflammation by Innate and Adaptive Lymphocytes/ D.A. Cronkite, T. M. Strutt// Journal of Immunology Research. – 2018. – V. 2018. – P. 1467538.

53. Crooks L. Consequences of Epistasis on Growth in an Erhualian × White Duroc Pig Cross./ L. Crooks, Y. Guo// PLoS One. – 2017. – V. 12(1). – P.e0162045.

54. Crosby C.M. Tissue-specific functions of invariant natural killer T cells/ C.M. Crosby, M.Kronenberg // Nat Rev Immunol. – 2018. – V. 18(9). – P. 559-574.

55. Davis G. S. Intermingled Klebsiella pneumoniae Populations Between Retail Meats and Human Urinary Tract Infections/ G. S. Davis, K. Waits, L.

Nordstrom, B.Weaver et al.// Clinical Infection Diseases. – 2015. – V. 61(6). – P. 892–899.

56. Done H. Y. Does the Recent Growth of Aquaculture Create Antibiotic Resistance Threats Different from those Associated with Land Animal Production in Agriculture?/ H. Y. Done, A. K. Venkatesan, R. U. Halden// AAPS Journal. – 2015. – V. 17(3). – P. 513–524.

57. Duan J. Dietary glutamate supplementation ameliorates mycotoxin-induced abnormalities in the intestinal structure and expression of amino acid transporters in young pigs/ J. Duan, J. Yin, M. Wu, P. Liao, et al.//PLoS One. -2014. – V. 9(11). – P.e112357.

58. Eberl G. Innate Lymphoid Cells: a new paradigm in immunology/ G. Eberl, M. Colonna, J. P. Di Santo, A. N.J. McKenzie/ Science. – 2017. - V. 348, I. 6237. – P. aaa6566.

59. Economou V. Agriculture and food animals as a source of antimicrobial-resistant bacteria/V. Economou, P. Gousia// Infect Drug Resist. – 2015. – V. 8. – P. 49–61.

60. Egger-Danner C. Invited review: overview of new traits and phenotyping strategies in dairy cattle with a focus on functional traits/ C. Egger-Danner , J.B. Cole, J.E. Pryce, N. Gengler, et al//. Animal. – 2015. – V. 9 (2). – P. 191-207.

61. Farahmand M. Application of recombinant proteins for serodiagnosis of visceral leishmaniasis in humans and dogs / M. Farahmand, H. Nahrevanian // Iranian Biomedical Journal. – 2016. - V. 20, I. 3. – P. 128-134.

62. Fouad A.M. Impact of Heat Stress on Meat, Egg Quality, Immunity and Fertility in Poultry and Nutritional Factors That Overcome These Effects: A Review/ A.M. Fouad, W. Chen, D. Ruan, S. Wang, et al// International Journal of Poultry Science. – 2016. – V.15. – P. 81-95.

63. Garrett R. H. Biochemistry/ R.H. Garrett, C.M. Grisham// Canada: Brooks// Cole, 5th Edition. – 2013.

64. Goncharuk V. V. Revealing water's secrets: deuterium depleted water/ V. V. Goncharuk, A. A. Kavitskaya, I. Y. Romanyukina, O. A. Loboda // Chemistry Central journal. – 2013. - 7(1). – P. 103.

65. Gudyrev O. The results of the study of the carcinogenic properties of glucosaminylmuramyldipeptide GMDP in chronic experiments in mice and rats / O. Gudyrev, T. Andronova, E. Nesterova// Research Results in Pharmacology. – 2018. – V. 4(4). – P. 97-106.

66. Gupta N. New Players in Immunity to Tuberculosis: The Host Microbiome, Lung Epithelium, and InnateImmune Cells/ N. Gupta, R. Kumar, B. Agrawal// Frontal Immunology. – 2018. – V. 9. – P. 709.

67. Hillenkamp F. Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of biopolymers/ Karas M. Beaveis R.C., Chait B.T.//Anal. Chem. - 1991. - Vol. 63(24).- P. 1193A-1203A.

68. Hirano H. Varietal differences of leaf protein profiles in mulberry/ H. Hirano// Phytochemistry. – 1982. – V. 21, № 7. – P. 1513-1518.

69. Jain A. Innate control of adaptive immunity: Beyond the three-signal paradigm/ A. Jain, C. Pasare//Journal of Immunology. – 2017. – V. 198(10). – P. 3791–3800.

70. Jassim S. A. A. Natural solution to antibiotic resistance: bacteriophages ‘The Living Drugs’/ S. A. A. Jassim, R. G. Limoges// World Journal of Microbiological Biotechnology. – 2014. – V. 30(8). – P. 2153–2170.

71. Kalantari H. Ameliorative effects of red lentil extract on sodium arsenite-induced oxidative stress in rats / H. Kalantari, G. Houshmand, A. Hasanvand, M. Goudarzi, et al// Jundishapur Journal of Natural Pharmaceutical Products. – 2017. – V. 12. – P. e64309.

72. Kell A. Pathogen-Associated Molecular Pattern Recognition of Hepatitis C Virus Transmitted/Founder Variants by RIG-I Is Dependent on U-Core Length/ A. Kell, M. Stoddard, H. Li, J. Marcotrigiano// Journal of Virology. – 2015. – Vol. 89(21). - P.11056–11068.

73. Klein G. Antibiotic Resistance Patterns of Enterococci and Occurrence of Vancomycin-Resistant Enterococci in Raw Minced Beef and Pork in Germany/ G. Klein, A. Pack, G. Reuter// Application Environmental Microbiology. – 1998. – V. 64(5). – P. 1825–1830.

74. Kotenkova E.A. Antimicrobial compounds of porcine mucosa/ E.A. Kotenkova, E.A. Lukinova, L.V. Fedulova //IOP Conference Series: Earth and Environmental Science. – 2017. – V. 85. № 1. – P. 012068.

75. Lafarga T. Bioactive peptides from meat muscle and by-products: generation, functionality and application as functional ingredients / T. Lafarga, M. Hayes // Meat science. — 2014. №98. P. 227–239.

76. Langdon A. The effects of antibiotics on the microbiome throughout development and alternative approaches for therapeutic modulation/ A. Langdon, N. Crook, G. Dantas// Genome Med. – 2016. – V. 8. – P. 39.

77. Lerma L.L. Antibiotic Multiresistance Analysis of Mesophilic and Psychrotrophic Pseudomonas spp. Isolated from Goat and Lamb Slaughterhouse Surfaces throughout the Meat Production Process/ L. L. Lerma, N. Benomar, M. del Carmen Casado Muñoz, A. Gálvez, et al// Appl Environ Microbiol. – 2014. – V. 80(21). – P. 6792–6806.

78. Levy O. Innate immune memory: implications for development of pediatric immunomodulatory agents and adjuvanted vaccines/ O. Levy, M. G. Netea// Pediatr Res. – 2014. – V. 75(0). – P. 184–188.

79. Li Y. *Rhodiola rosea L.:* an herb with anti-stress, anti-aging, and immunostimulating properties for cancer chemoprevention/ Y. Li, V. Pham, M. Bui, et al. // Curr Pharmacol Rep. – 2017. – V. 3(6). – P. 384–395.

80. Liao S.F. Using probiotics to improve swine gut health and nutrient utilization. / S.F. Liao, M. Nyachoti //Animal Nutrition. – 2017. – V. 3(4). – P. 331-343.

81. Lori A. The spleen: A hub connecting nervous and immune systems in cardiovascular and metabolic diseases/ A. Lori, M. Perrotta, G. Lembo, D. Carnevale//International journal of molecular sciences. – 2017. – V. 18 (6). – P. 1216.

82. Maazi H. Type two innate lymphoid cells; the Janus cells in health and disease/ H. Maazi, O. Akbari// Immunological reviews. – 2017. – V.278(1). – P.192-206.

83. Manyi-Loh C. Antibiotic Use in Agriculture and Its Consequential Resistance in Environmental Sources: Potential Public Health Implications/ C. Manyi-Loh, S. Mamphweli, E. Meyer, A. Okoh// Molecules. – 2018. – V. 23(4). – P. 795.

84. Martínez-Maqueda D. Extraction/fractionation techniques for proteins and peptides and protein digestion/ D. Martínez-Maqueda// Proteomics in Foods. – Springer, Boston, MA. – 2013. –21-50 c.

85. McEachran A.D. Antibiotics, bacteria, and antibiotic resistance genes: aerial transport from cattle feed yards via particulate matter/ A.D. McEachran, B.R. Blackwell, J.D. Hanson, K.J. Wooten et al.// Environ Health Perspect. – 2015. – V.123(4). – P.337-43.

86. Meek R. W. Nonmedical Uses of Antibiotics: Time to Restrict Their Use?/ R. W. Meek, H. Vyas, L. J. V. Piddock// PLoS Biolology. – 2015. – V. 13(10). – P. e1002266.

87. Melo-Gonzalez F. Functional and phenotypic heterogeneity of group 3 innate lymphoid cells/ F. Melo-Gonzalez, Matthew R. Hepworth//Immunology. – 2017. – V. 150(3). – P. 265–275.

88. Messele Y. E. Molecular determination of antimicrobial resistance in Escherichia coli isolated from raw meat in Addis Ababa and Bishoftu, Ethiopia/ Y. E. Messele, R. D. Abdi, S. T. Yalew, D. T. Tegegne et al//Ann Clinical Microbiolology Antimicrobial. – 2017. – V. 16. – P. 55.

89. Mora L. New approaches based on comparative proteomics for the assessment of food quality/ L. Mora, M. Gallego, F. Toldra// Current Opinion in Food Science. – 2018. – V. 22. – P. 22-27.

90. Nelson M. I. Reverse zoonosis of influenza to swine: new perspectives on the human-animal interface/ M. I. Nelson, A. L. Vincent // Trends in microbiology. – 2015. – V. 23(3). – P. 142–153.

91. Netea M. G. Trained immunity: a program of innate immune memory in health and disease/ M. G. Netea, L. A.B. Joosten, E. Latz, K. H.G. Mills, et al// Science. – 2017. – V. 352, I. 6284. – P. aaf1098.

92. Nhung N. T. Antimicrobial residues and resistance against critically important antimicrobials in non-typhoidal Salmonella from meat sold at wet markets and supermarkets in Vietnam /N. T. Nhung, N. T. B. Van, N. Van Cuong, T. T. Quy Duong, et al//International Journal of Food Microbiology. – 2018. - V. 266. – P. 301–309

93. Novoseletskaya A.V. Thymus Polypeptide Preparation Tactivin Restores Learning and Memory in Thymectomied Rats/ A.V. Novoseletskaya, N.M. Kiseleva, I.V. Zimina, O.V. Bystrova et al.// Bull Exp Biol Med. – 2015. – V. 159(5). – P. 623-5.

94. Novoseletskaya A.V.The influence of the thymus peptides on analgesia caused by acute and chronic immobilization/ A.V. Novoseletskaya, N.M. Kiseleva, O.V. Belova, I.V. Zimina // Vestn Ross Akad Med Nauk. – 2015. – V. 1. – P.113-7.

95. Oliynyk S. Actoprotective effect of ginseng: improving mental and physical performance/ S. Oliynyk, O. Seikwan// Journal of ginseng research. – 2013. – V.37(2) - P.144-66.

96. Osman K. Antimicrobial resistance and virulence characterization of Staphylococcus aureus and coagulase-negative staphylococci from imported beef meat/ K. Osman, A. Alvarez-Ordóñez, L. Ruiz, J. Badr, et al//Ann Clin Microbiol Antimicrob. – 2017. – V. 16. – P. 35.

97. Pershin S.M. Multiple increase in productivity of the yeast at reducing the fraction of D2O in water/ S.M. Pershin, E.Sh. Ismailov, M.M. Dibirova, M.E. Akhmedov et al.// Doklady Biochemistry and Biophysics. – 2017. – V. 476. – P. 299–302.

98. Pighin D. A Contribution of Beef to Human Health: A Review of the Role of the Animal Production Systems / D. Pighin, A. Pazos, V. Chamorro, F. Paschetta, et al//Scientific World Journal. – 2016. – Vol. 2016. – P. 8681491.

99. Pulendran B. Innate Immune Sensing and Response to Influenza/ B. Pulendran, M. S. Maddur// Curr Top Microbiol Immunol. – 2015. – V. 386. – P. 23–71.

100. Q-H Wang D. Therapeutic uses of animal biles in traditional Chinese medicine: An ethnopharmacological, biophysical chemical and medicinal review/ Q-H Wang D., Carey M. C. // World J Gastroenterol. – 2014. – V. 20(29). – P. 9952–9975.

101. Quinn K.M. Antigen expression determines adenoviral vaccine potency independent of IFN and STING signaling/ K. M. Quinn, D. E. Zak, A.Costa, A. Yamamoto, et al.// Journal of Clinical Investigation. – 2015. – V. 125(3). – P. 1129–1146.

102. Rahimi E. Prevalence of Clostridium difficile in raw beef, cow, sheep, goat, camel and buffalo meat in Iran/ E. Rahimi, M. Jalali, J. S. Weese// BMC Public Health. – 2014. – V. 14. – P. 119.

103. Raposo B. T cells specific for post-translational modifications escape intrathymic tolerance induction/ B. Raposo, P. Merky, C. Lundqvist, H. Yamada, et al// Nature Communications. – 2018. – V. 9, I. 1. - №353.

104. Rasooli, A., Fatemi, F., Hajihosseini, R., Vaziri, A., Akbarzadeh, K., Mohammadi Malayeri, M. R., … Foroutanrad, M. (). Synergistic effects of deuterium depleted water and Mentha longifolia L. essential oils on sepsis-induced liver injuries through regulation of cyclooxygenase-2. Pharmaceutical biology, 57(1), 125–132. doi:10.1080/13880209.2018.1563622

105. Rehakova R. Effect of Deuterium-Depleted Water on Selected Cardiometabolic Parameters in Fructose-Treated Rats / R. Rehakova, J. Klimentova, M. Cebova, A. Barta et al. // Physiol. Res. – 2016. – V. 65 (Suppl. 3). – P. S401-S407.

106. Rehman S.U. Review on a Traditional Herbal Medicine, Eurycoma longifolia Jack (Tongkat Ali): Its Traditional Uses, Chemistry, Evidence-Based Pharmacology and Toxicology. / S.U. Rehman, K. Choe, H.H. Yoo// Molecules. – 2016. – V.21(3). – P. 331.

107. Romo M.R. Innate immunity in vertebrates: an overview/ M. R. Romo, D. Pérez-Martínez, C. Castillo Ferrer// Immunology. – 2016. – V. 148(2). – P. 125–139.

108. Ruwali P. *In vitro* immunomodulatory potential of *Artemisia indica* Willd. in chicken lymphocytes/ P. Ruwali, T.K. Ambwani, P. Gautam //Vet World. – 2018. – V.11(1). – P. 80–87.

109. Salehi B. Medicinal plants used in the treatment of human immunodeficiency virus / B. Salehi, N.V. Anil Kumar, B. Şener,et al// International Journal of Molecular Sciences. – 2018. – V. 19, I. 5. - №1459.

110. Sandbulte M.R. Optimal Use of Vaccines for Control of Influenza A Virus in Swine./ M.R. Sandbulte, A.R. Spickler, P.K. Zaabel, J.A. Roth // Vaccines (Basel). – 2015. – V. 3(1). – P.22–73.

111. Schmidt J. W. Occurrence of Antimicrobial-Resistant Escherichia coli and Salmonella enterica in the Beef Cattle Production and Processing Continuum/ J. W. Schmidt, G. E. Agga, J. M. Bosilevac, D. M. Brichta-Harhay, et al// Application Environmental Microbiology. – 2015. – V. 81(2). – P. 713–725.

112. Shaik, J. S. Soluble epoxide hydrolase inhibitor trans-4-[4-(3-adamantan-1-yl-ureido)-cyclohexyloxy]-benzoic acid is neuroprotective in rat model of ischemic stroke. American journal of physiology/ J. S.Shaik,M. Ahmad, W. Li, M. Rose et al.// Heart and circulatory physiology. – 2013. V. 305(11) - P. H1605–H1613.

113. Shishavan, N.G. The effects of pomegranate (Punica granatum L.) peel methanolic extract on methotrexate induced changes in hepatic antioxidant enzymes of rats/ N.G. Shishavan, M.M. Abbasi, R.A. Afshar, P.Z. Milani, et al // Jundishapur Journal of Natural Pharmaceutical Products – 2017. – V. 12(1). – P. e57499.

114. Shousha A. Bacteriophages Isolated from Chicken Meat and the Horizontal Transfer of Antimicrobial Resistance Genes/ A. Shousha, N. Awaiwanont, D. Sofka, F. J. M. Smulders, et al// Application Environment Microbiology. – 2015. – V. 81(14). – P. 4600–4606.

115. Smith R. A. Understanding the Public's Intentions to Purchase and to Persuade Others to Purchase Antibiotic-Free Meat/ R. A. Smith, X. Zhu, K. Shartle, L. Glick, et al// Health Commun. – 2017. – V. 32(8). – P. 945–953.

116. Soler C. Digestive microbiota is different in pigs receiving antimicrobials or a feed additive during the nursery period/ C. Soler, T. Goossens, A. Bermejo, L. Migura-García et al.// PLoS One. – 2018. – V13(5). – P.e0197353.

117. Souto W.M.S. Zootherapeutic uses of wildmeat and associated products in the semiarid region of Brazil: general aspects and challenges for conservation/ W.M.S. Souto, R.R.D. Barboza, H. Fernandes-Ferreira, et al.// J Ethnobiol Ethnomed. – 2018. – V. 14(1). – P. 60.

118. Średnicka-Tober D. Composition differences between organic and conventional meat: a systematic literature review and meta-analysis/ D. Średnicka-Tober, M. Barański, C. Seal et al.// British journal of nutrition. – 2016. – V.115(6). – P.994–1011.

119. Strekalova T. Deuterium content of water increases depression susceptibility: the potential role of a serotonin-related mechanism / T. Strekalova, M. Evans, A. Chernopiatko, Y. Couch et al// Behavioural Brain Research. - 2015. - V. 277. - P. 237-244.

120. Sun Z. Synergistic antibacterial mechanism of the Lactobacillus crispatus surface layer protein and nisin on Staphylococcus saprophyticus/ Z. Sun, P. Li, F. Liu, H. Bian, et al.// Science Report. – 2017. – V. 7. – P. 265.

121. Sundareswaran L. Effect of Scoparia dulcis on noise stress induced adaptive immunity and cytokine response in immunized Wistar rats/ L. Sundareswaran, S. Srinivasan, W. Wankhar, R. Sheeladevi// J Ayurveda Integr Med. – 2017. – V.8(1). – P. 13-19.

122. Teow S.Y.Bactericidal Properties of Plants-Derived Metal and Metal Oxide Nanoparticles (NPs)/ S.Y. Teow, M.M. Wong, H.Y. Yap, S.C. Peh// Molecules. – 2018. – V. 23(6). – P.1366.

123. Thakur M. Immunomodulatory Activity of Chlorophytum borivilianum Sant. F. / M. Thakur, S. Bhargava, V.K. Dixit// Evid Based Complement Alternat Med. – 2007. – V.4(4). – P.419–423.

124. Vossenkuhl B. Comparison of spa Types, SCCmec Types and Antimicrobial Resistance Profiles of MRSA Isolated from Turkeys at Farm, Slaughter and from Retail Meat Indicates Transmission along the Production Chain/ B. Vossenkuhl, J. Brandt, A. Fetsch, A. Käsbohrer, et al//PLoS One. – 2014. – V. 9(5). – P. e96308.

125. Weaver A.C. The use of feed additives to reduce the effects of aflatoxin and deoxynivalenol on pig growth, organ health and immune status during chronic exposure/ A.C. Weaver, M.T. See, J.A. Hansen, Y.B. Kim, et al.// Toxins (Basel). – 2013. – V. 5(7). – P.1261-81.

126. Werz O. Human macrophages differentially produce specific resolvin or leukotriene signals that depend on bacterial pathogenicity / O. Werz, J. Gerstmeier, S. Libreros, X. De La Rosa, et al. // Nature Communications. – 2018. – V. 9, I. 1. – №02538.

127. Whitford D. Proteins: structure and function/ D. Whitford // John Wiley & Sons. – 2013.

128. World Organisation for Animal Health [электронный ресурс]. – 2019. – Дата обращения: 22.03.2019. URL: https://www.oie.int

129. Xiang L. Natural plant products in treatment of pulmonary arterial hypertension/ L. Xiang, Y. Li, X. Deng, D. Kosanovic et al.// Pulm Circ. – 2018. - V.8(3). - №2045894018784033.

130. Xu Y.J. Differential proteome analysis of porcine skeletal muscles between Meishan and Large White / Y.J. Xu, M.L. Jin, L.J. Wang, A.D. Zhang, B. Zuo et al. // Journal of Animal. – 2009. – V. 87 (8). – P. 2519-27.

131. Zhang X. Prevalence of Veterinary Antibiotics and Antibiotic-Resistant Escherichia coli in the Surface Water of a Livestock Production Region in Northern China/ X. Zhang, Y. Li, B. Liu, J. Wang, et al// PLoS One. – 2014. – V. 9(11). – P. e111026.

132. Zlatska A. In Vitro Study of Deuterium Effect on Biological Properties of Human Cultured Adipose-Derived Stem Cells./ A. Zlatska, I. Gordiienko, R. Vasyliev, D. Zubov, et al.// The Scientific World Journal. - V. 2018. – P. 5454367.