



УКРАЇНА

(19) UA (11) 19923 (13) U  
(51) МПК (2006)  
C12N 5/06МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ  
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІОПИС  
ДО ПАТЕНТУ  
НА КОРИСНУ МОДЕЛЬвидається під  
відповідальність  
власника  
патенту

(54) СПОСІБ ВИГОТОВЛЕННЯ БІОЛОГІЧНОГО ІМУНОСТИМУЛЮЮЧОГО ПРЕПАРАТУ ДЛЯ ПТИЦІ "ЦИТОСОЛ-АВІ" ("CYTHOSOL-AVI")

1

2

(21) u200604239

(22) 17.04.2006

(24) 15.01.2007

(46) 15.01.2007, Бюл. № 1, 2007 р.

(72) Герілович Антон Павлович, Білокінь Віктор Степанович, Заремба Олександр Васильович, Мороз Оксана Євгенівна

(73) НАЦІОНАЛЬНИЙ НАУКОВИЙ ЦЕНТР "ІНСТИТУТ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ І КЛІНІЧНОЇ ВЕТЕРИНАРНОЇ МЕДИЦИНИ"

(57) Спосіб виготовлення біологічного імуностимулюючого препарату для птиці, що включає збір, активацію, культивування лімфоцитів та звільнення від клітинного детриту, який відрізняється тим, що трипсинізують селезінки інтактної птиці, стимулюють спленоцитарні лімфоцити конканаваліном А у дозі 5-10 мкг/мл, культивують від 8 до 12 годин та стерилізують фільтруванням.

Корисна модель відноситься до ветеринарної мікробіології, вірусології, імунології та біотехнології, зокрема, до виготовлення, контролю якості та імуностимулюючих препаратів для потреб птахівництва.

Імуностимулюючі засоби є важливим аспектом основних схем профілактики в промисловому птахівництві як товарного, так і племінного напрямків. Широкого впровадження набули різноманітні препаративні форми: від антибіотичних та сульфаніламідних речовин, до продуктів рослинного походження. Найвища ефективність з-поміж цих субстанцій безумовно характерна препаратам цитокінового ряду, їх попередникам та активаторам як тваринного походження, так і рекомбінантним. Існують різні технологічні моделі щодо виготовлення препаратів такого плану.

Зокрема, клас синтетичних попередників інтерферону (циклоферон та його аналоги), поряд з високою противірусною ефективністю при гострих вірусних захворюваннях, мають виражений імуносупресивний вплив за рахунок дисфункцій інших ланок системи цитокінових медіаторів.

Способи виготовлення препаратів цитокінів природного походження базуються на зборі та очищенні продуктів життєдіяльності лімфоцитів, активованих мітогеном ФГА [Kaiser P., Tisher F. Evolution of the interleukins // Developmental and Comparative Immunology. - 2004. - N 28. - P.375-394]. Виготовлення препаратів на основі тканинних екстрактів з вмістом відповідного детриту [Грінченко Д.М., Апатенко В.М. Імунізація курчат лімфоїд-

ним препаратом// Птахівництво. - вип.57. - 2005. - С:390-392] є також малоефективним, до того ж препарати мають реактогенні властивості та можливість призвести до реакцій гіперчутливості в організмі.

Існує спосіб отримання природних цитокінів, що базується на використанні мітогенної стимуляції лімфоцитів периферичної крові інфрачервоним світлом [Патент Российской федерации 99108178/14, RU 2149643 СІ Слабкая Е.В., Мешкова Р.Я., Федоров Г.Н. Способ получения природных цитокинов. Смоленская государственная медицинская академия. Заявл.07.04.1999, Опубл.27.05.2000.]. Цей спосіб забезпечує збір, активацію, культивування лімфоцитів, звільнення від клітинного детриту. Активуються секреції окремих цитокінів, зокрема ФНП-α. Це рішення може бути прототипом.

Недоліком прототипу є те, що за цим способом використовуються лімфоцити з крові, виділення яких є трудомістким, окрім того, потребує наявності лазерного генератора інфрачервоного світла. Сукупність цих технологічних вимог значно здорожує передбачуваний кінцевий продукт.

В основу корисної моделі поставлено задачу розробити спосіб виготовлення біологічного імуностимулюючого препарату для птиці, який включає збір, активацію, культивування лімфоцитів та звільнення від клітинного детриту шляхом трипсинізації селезінки інтактної птиці, стимуляції спленоцитарних лімфоцитів конканаваліном А у дозі 5-10 мкг/мл, культивування від 8- до 12 годин, та сте-

(13) U

(11) 19923

(19) UA

рилізації фільтруванням, щоб забезпечити спосіб виготовлення біологічного імуностимулюючого препарату для птиці "Цитосол-АВІ" ("Cythosol-AVI").

Спосіб виконується таким чином.

Від клінічно здорової птиці віком 2-4 місяці при забої відбирають матеріал у вигляді селезінок, триразово відмивають у розчині Хенксу з антибіотиками та фунгістатиками: канаміцин сульфат та стрептоміцин (500 ОД/мл), а також ністатин (50 мг/мл). Селезінки звільняють від капсул та подрібнюють на шматки розміром 5х5х5 мм, які ще раз промивають розчином Хенксу з аналогічними концентраціями антибіотичних речовин, після чого до них додають 0,3% розчин трипсину, підігрітий до температури 37°C з розрахунку 1:10 до об'єму тканини. Шляхом подальшого перемішування за допомогою магнітної мішалки отримують суспензію спленоцитів. Після диспергування спленоцитів до стану гомогенної суспензії додають 2% сироватки крові великої рогатої худоби для нейтралізації активності трипсину. Отриману суспензію центрифугують при 1500g впродовж 30 хвилин. Супернатант зливають, вносять приблизно 1/3 від початкового об'єму живильного середовища 199. З поверхневої частини осаду обертовими рухами змивають шар лейкоцитів (має сіро-жовте забарвлення).

Лейкоцитарну фракцію ретельно перемішують, після чого визначають концентрацію клітин в суспензії. Вона повинна дорівнювати 70000-100000 кл./мл. При необхідності її можна сконцентрувати центрифугуванням, або розвести.

До суспензії клітин у живильному середовищі додають конканавалін А у концентрації 5-10 мг/мл середовища. Суспензію інкубують впродовж 8-12 годин при 37,5-39°C, після чого центрифугують, відбирають супернатант та стерилізують за методом ультрафільтрації [фільтр типу Mslipore, діаметр пор 10 нм або пропускна здатність 40 кДа].

Активність препарату визначають за інтерфероном в реакції блокування ЦПД вірусу ньюкаслської хвороби на культурі фібробластів ембріонів курей. Мінімальна активність має дорівнювати 100000 МО/мл. При необхідності препарат розводять живильним середовищем 199.

Рідка препаративна форма зберігається при 4°C від 6 до 8 місяців та більше 2 років після ліофільного висушування.

Ефективність способу розкривається в прикладах.

Приклад 1.

Підбір субстрату для вилучення лімфоцитів. В дослід було взято чотири різновиди лімфоїдної тканини: кров, зразки тимусу, селезінки та фабрицієвої бурси.

З гепаринізованої крові лімфоцити видаляли методом диференційного центрифугування. Їх концентрація склала  $3,1 \pm 0,4$  млн./мл, в той час, як в крові вона сягала  $7,4 \pm 0,25$  млн./мл. Ефективність виділення лімфоцитів з тимусу та селезінки склала 70,62 та 86,53%, а їх вихід склав 19-22 млн. клітин з 1г селезінкової тканини. З фабрицієвої сумки встановлено дуже малий вихід життєздатних лімфоцитів, що можна пояснити особливостями будови цього органу.

Приклад 2.

Підбір концентрації мітогену та умов стимуляції лімфоцитів. В якості мітогенів використано фітогемаглютинін із зародків пшениці (ФГА, виробництва фірми «Sigma-Aldrich Ltd», США), конканавалін А (КонА, виробництва фірми «ПанС-ко», Росія) та гемаглютинін зі шкаралупи волоського горіху (PNG, Lohman Animal Health GmbH & Co. KG, Німеччина).

За умов дії на культури клітин CEF та Vero перелічені мітогени активують їх проліферативні процеси на 50% та 72% на 8 та 12 годину інкубації (за методом прямого підрахунку концентрацій у порівнянні до неактивованого контролю) при застосуванні в концентраціях 1 мг/мл середовища для ФГА, 10 мг/мл середовища для Кон А та 5 мг/мл - для PNG.

Вибір Кон А обумовлений його більш м'якою дією на мітотичний апарат клітин та порівняльно дешевою собівартістю.

При аналогічній стимуляції суспензії лейкоцитів (100000 клітин/мл) після 8-12-добової інкубації показник приросту клітинної концентрації становив від 48% до 56%, активність інтерферону у звільненому від клітин середовищі зареєстрована на рівні 40000 МО/мл.

Сукупність цих технологічних вимог значно здешевлює передбачуваний кінцевий продукт.

Спосіб виготовлення біологічного імуностимулюючого препарату для птиці "Цитосол-АВІ" ("Cythosol-AVI") є економічним та ефективним для виробництва птаховничої продукції.

Таблиця 1

Група	РЗГА		РНГА	
	Доба дослідження			
	14	21	14	21
Фонові антитіла	2,20±0,51 log <sub>2</sub>		1,56±0,32 log <sub>2</sub>	
Контроль	4,6±0,24 log <sub>2</sub>	4,0±0,55 log <sub>2</sub>	4,6±0,40 log <sub>2</sub>	4,2±0,20 log <sub>2</sub>
Аерозольна обробка	6,4±0,24 log <sub>2</sub> ***	6,4±0,51 log <sub>2</sub> **	6,4±0,40 log <sub>2</sub> **	6,2±0,37 log <sub>2</sub> **
Внутрішньо-м'язова обробка	6,6±0,24 log <sub>2</sub> ***	7,0±0,45 log <sub>2</sub> ***	6,0±0,32**	6,5±0,45 log <sub>2</sub> ***
Пероральна обробка	5,8±0,37**	6,2±0,32**	5,6±0,37**	5,5±0,42***

Примітка: \*\* -  $P < 0,01$ , \*\*\* -  $P < 0,001$  - різниця вірогідна по відношенню до контролю

Таблиця 2

Група	Концентрація загального білка, г/л	Концентрація альбумінів, г/л	Концентрація глобулінів, г/л	Концентрація серомукоїдів, мг/л	Концентрація ЦІК, мг/л
Контроль	39,28±1,01	16,5±0,46	22,62±1,20	0,25±0,01	0,14±0,01
Аерозольна обробка	42,1±2,12	16,07±0,76	26,04±1,76	0,29±0,01	0,15±0,02
Внутрішньом'язова обробка	45,48±3,43	16,17±0,93	29,35±3,70	0,29±0,01	0,15±0,02
Пероральна обробка	44,88±2,08	15,8±1,04	29,06±1,07	0,33±0,06	0,16±0,01