

<https://doi.org/10.21603/2074-9414-2022-2-2364>
<https://elibrary.ru/QUCWIR>

Оригинальная статья
<https://fptt.ru>

Разработка технологии выделения и исследования иммуотропного действия бурсальных пептидов на мышцах с экспериментальным иммунодефицитом



Н. А. Кольберг¹, Н. В. Тихонова¹, С. А. Тихонов^{1,*},
С. А. Леонтьева¹, И. Ю. Сергеева²

¹ Уральский государственный экономический университет^{ROR}, Екатеринбург, Россия

² Кемеровский государственный университет^{ROR}, Кемерово, Россия

Поступила в редакцию: 14.02.2022

Принята после рецензирования: 28.03.2022

Принята в печать: 17.05.2022

*С. А. Тихонов: tihonov75@bk.ru,

<https://orcid.org/0000-0003-4863-9834>

Н. А. Кольберг: <https://orcid.org/0000-0002-6548-5104>

Н. В. Тихонова: <https://orcid.org/0000-0001-5841-1791>

С. А. Леонтьева: <https://orcid.org/0000-0003-0832-4547>

И. Ю. Сергеева: <https://orcid.org/0000-0002-1686-0131>

© Н. А. Кольберг, Н. В. Тихонова, С. А. Тихонов,
С. А. Леонтьева, И. Ю. Сергеева, 2022



Аннотация.

Пептиды обладают высокой биологической активностью. Технологические режимы гидролиза белка определяют активность биопептидов. Целью исследования является выделение пептидов из фабрициевой сумки и оценка их иммуотропного действия на мышцах различных линий с экспериментальным иммунодефицитом путем изучения морфофункционального состояния органов иммунопоза (тимус и селезенка).

В качестве объектов исследования выбраны гидролизат фабрициевой сумки, пептиды, тимус и селезенка мышей-самцов. Аминный азот определяли по ГОСТ Р 55479-2013, молекулярную массу пептидов – гелеэлектрофорезом. Морфометрию тимуса и селезенки рассчитывали с помощью программы ВидеоТест-Морфология 5.0.

Определены рациональные режимы ферментативного гидролиза белка фабрициевой сумки папаином с последующим выделением пептидов методом ультрафильтрации. По содержанию аминного азота в гидролизате фабрициевой сумки определена рациональная концентрация фермента папаина – 0,15 %. Молекулярная масса пептидов после ультрафильтрации гидролизата фабрициевой сумки через мембраны с проницаемостью до 43 кДа распределяется в разных значениях и зависит от концентрации папаина, времени гидролиза и температуры. Максимальное количество пептидов с молекулярной массой от 27 до 18 кДа выделено при температуре гидролиза 36 °С (85 %), концентрации папаина 0,15 % (73 %), гидромодуле 1:3 (78 %) и времени гидролиза сырья 6 ч (82 %). Рациональные технологические параметры гидролиза белка фабрициевой сумки следующие: концентрация папаина 0,15 %, температура 36 °С, гидромодуль 1:3, время гидролиза 6 ч. Введение бурсальных пептидов иммунодефицитным мышам препятствует снижению общей клеточности в тимусе и уменьшению содержания CD3⁺ клеток, активизирует созревание Т-лимфоцитов и пролиферацию В-лимфоцитов, а также снижает иммуноцитотоксические эффекты от циклофосамида.

Практическая значимость проведенного исследования заключается в перспективности использования разработанной технологии получения новых пептидов с выраженным иммуотропным действием и рассмотрении возможности их включения в рецептуру пищевой продукции специализированного назначения.

Ключевые слова. Пептиды, фабрициева сумка, гидролиз, тимус, селезенка, иммунодефицит, лабораторные животные

Для цитирования: Разработка технологии выделения и исследования иммуотропного действия бурсальных пептидов на мышцах с экспериментальным иммунодефицитом / Н. А. Кольберг [и др.] // Техника и технология пищевых производств. 2022. Т. 52. № 2. С. 296–309. <https://doi.org/10.21603/2074-9414-2022-2-2364>

Immunotropic Effect of Bursal Peptides on Mice with Experimental Immunodeficiency

Natalia A. Kolberg¹, Natalia V. Tikhonova¹, Sergei L. Tikhonov^{1,*},
Svetlana A. Leontieva¹, Irina Yu. Sergeeva²

¹ Ural State University of Economics^{ROR}, Yekaterinburg, Russia

² Kemerovo State University^{ROR}, Kemerovo, Russia

Received: 14.02.2022
Revised: 28.03.2022
Accepted: 17.05.2022

*Sergei L. Tikhonov: tikhonov75@bk.ru,
<https://orcid.org/0000-0003-4863-9834>
Natalia A. Kolberg: <https://orcid.org/0000-0002-6548-5104>
Natalia V. Tikhonova: <https://orcid.org/0000-0001-5841-1791>
Svetlana A. Leontieva: <https://orcid.org/0000-0003-0832-4547>
Irina Yu. Sergeeva: <https://orcid.org/0000-0002-1686-0131>

© N.A. Kolberg, N.V. Tikhonova, S.L. Tikhonov,
S.A. Leontieva, I.Yu. Sergeeva, 2022



Abstract.

Peptides are biologically active. This quality depends on the technological modes of protein hydrolysis. The research objective was to isolate peptides from the bursa fabricii and evaluate their immunotropic effect on mice of various lines with experimental immunodeficiency and the morphofunctional state of their immunopoiesis organs, i.e., thymus and spleen.

The research featured bursa fabricii hydrolysate and peptides, as well as thymus and spleen of male mice. Amine nitrogen was determined according to State Standard R 55479-2013; molecular weight of peptides was determined by gel electrophoresis. The morphometry of the thymus and spleen was calculated using VideoTesT-Morphology 5.0.

The research revealed the rational modes of enzymatic hydrolysis of the bursa fabricii protein by papain with subsequent isolation of peptides by ultrafiltration. According to the content of amine nitrogen in the bursa fabricii hydrolysate, the rational concentration of the papain enzyme was 0.15%. The molecular weight of peptides after ultrafiltration of bursa fabricii hydrolysate through membranes with a 43 kDa permeability had different values and depended on the concentration of papain, hydrolysis time, and temperature. The maximal amount of 27–18 kDa peptides was isolated at 36°C (85%) when the concentration of papain was 0.15% (73%), the hydromodule was 1:3 (78%), and the hydrolysis time of the raw material was 6 h (82%). The rational technological parameters of the hydrolysis of the bursa fabricii protein were as follows: concentration of papain – 0.15%, temperature – 36°C, hydromodule – 1:3, and hydrolysis time – 6 h. In immunodeficient mice, bursal peptides prevented a decrease in total cellularity in the thymus, sustained the content of CD3⁺ cells, activated the maturation of T-lymphocytes and proliferation of B-lymphocytes, and reduced the immunocytotoxic effects of cyclophosphamide.

The article offers a new technology for obtaining peptides with a pronounced immunotropic effect that can be used in functional food production.

Keywords. Peptides, fabricius bag, hydrolysis, thymus, spleen, immunodeficiency, laboratory animals

For citation: Kolberg NA, Tikhonova NV, Tikhonov SL, Leontieva SA, Sergeeva IYu. Immunotropic Effect of Bursal Peptides on Mice with Experimental Immunodeficiency. Food Processing: Techniques and Technology. 2022;52(2):296–309. (In Russ.). <https://doi.org/10.21603/2074-9414-2022-2-2364>

Введение

При моделировании рецептуры пищевой продукции специализированного назначения в последнее время отдается предпочтение использованию коротких биологически активных пептидов [1]. Выделение пептидов из белка проводится методами пищевой биотехнологии, а именно ферментного гидролиза белка и мембранной ультрафильтрации. Из одного и того же сырья путем

регулирования биотехнологических параметров можно получить отличающиеся по последовательности аминокислот пептиды – действующие начала с различной функциональной направленностью. Следовательно, целесообразно экспериментально подбирать технологические режимы гидролиза белка (рН субстрата, температура и время гидролиза) с учетом концентрации протеолитического фермента и последующего выделения биопептидов [2].

Особенности свойств биоактивных пептидов как функционального источника питания обусловили интерес к выделению пептидных фракций или отдельных пептидов из ферментативных гидролизатов растительных и животных белков [3]. В литературе основное внимание уделяется получению пептидов путем ферментативного гидролиза белков глицинина, гороха, фасоли, амаранта и семян оливы [4–8].

R. A. M. Soares и др. разработана технология получения пептидов из белка амаранта путем гидролиза пепсином и трипсином с последующей фильтрацией гидролизата через мембраны с проницаемостью 3 кДа и очисткой с помощью колоночной хроматографии [7].

В результате гидролиза белка семян оливы алкалазой с последующей ультрафильтрацией гидролизата I. M. Prados и др. выделены тетрапептид, пентапептид и гексапептид [8].

Для увеличения выхода пептидов при ферментативном гидролизе белка используют обработку сырья ультразвуком и высоким гидростатическим давлением (ННР), а также внесением в субстрат молочнокислых бактерий. Молочнокислые бактерии могут как уменьшать количество нежелательных горьких пептидов, продуцируемых ферментативно гидролизованным белком, так и усиливать биоактивные эффекты пептидов [9]. Ферментативная экстракция при давлении от 50 до 200 МПа улучшает скорость извлечения биологически активных соединений из белка [10]. Это связано с тем, что давление может изменить структуру белка, заставляя его разворачиваться и обнажать сайт связывания, тем самым увеличивая скорость столкновения фермента с субстратом [11]. Это усиливает ферментативную активность, увеличивая скорость гидролиза белка и способствуя высвобождению активных пептидов [12]. Процесс гидролиза белка при повышении гидростатического давления усиливается [13].

В исследовании G.-W. Chen и M.-H. Yang выбраны наиболее эффективные протеазы из восьми широко используемых (протеаза N, протеаза A, пептидаза R, Умамизим G, протин SD-AY10 и NY100, алкалаза и нейтраз) для высвобождения пептидов с высокой ингибирующей активностью 3-гидрокси-3-метил-глутарил-коэнзим А редуктазы (HMGR) из *Streptomyces platensis* [14]. Гидролиз проводили при температуре 50 °С в течение 6 ч. Установлено, что ингибирующая способность группы пептидов, выделенных пептидазой R, была выше в 1,6 раза по сравнению с другими используемыми ферментами.

T. L. Q. Anh и др. разработана технология гидролиза белка сои [15]. Экспериментальным путем из трех ферментов (флавоурзим, протамекс и алкалаза) при одинаковом содержании выбран наиболее эффективный – флавоурзим. Установлено, что при сочетании термической обработки и ферментативного гидролиза выход пептидов достигал $61,44 \pm 0,22$ %.

Это выше, чем при использовании только ферментативного гидролиза – $52,57 \pm 0,27$ %. Гидролизат сои с использованием флавоурзима достиг среднего молекулярного размера 3,19 кДа при следующих оптимальных условиях: концентрация фермента $16,09 \text{ Ед} \cdot \text{г}^{-1}$, pH 7,02, температура 45,8 °С, соотношение бобы:вода 1:3.

D. M. Liu и др. утверждают, что при разработке способов получения белковых гидролизатов экономически эффективно использовать иммобилизованный фермент для гидролиза белка, поскольку иммобилизованный биокатализатор может быть извлечен в конце цикла гидролиза и повторно использован [16]. Кроме того, использование иммобилизованных ферментов позволяет осуществлять точный контроль степени реакции, исключая необходимость постгидролизной тепловой обработки для ферментативной инактивации и возможную модификацию структуры белка или пептида, вызванную этой обработкой.

В исследовании L. S. Kudryashov и др. разработана технология микрокапсулирования фермента пепсина в псевдокипящем слое 10 % водного раствора мальтодекстрина [17]. Соотношение твердого вещества к жидкому выдерживали в пределах $10:1 \pm 11,5:1$. Ожижающим агентом, в том числе в режиме сушки, был воздух с комнатной температурой, прокачиваемый через аппарат. Опытным путем была получена линейная зависимость ($P \leq 0,05$) средней толщины нанесения раствора мальтодекстрина на гранулу пепсина в зависимости от продолжительности нанесения. Определено, что через 2 мин обработки раствором мальтодекстрина на грануле пепсина образуется более $\frac{1}{4}$ толщины защитного поверхностного слоя от его среднего значения в конце процесса обработки, а после 6 мин – около 70 %.

S. L. Tikhonov и др. предложена технология получения двухкомпонентного ферментного препарата путем последовательного микрокапсулирования пепсина и папаина в псевдокипящем слое из мальтодекстрина [18]. Определены рациональные параметры иммобилизации ферментов для толщины защитного покрытия 6 мкм: скорость воздушного потока с 10 %-м раствором мальтодекстрина в узком сечении конуса рабочей камеры составляет 0,17 м/с, время – 6 мин. Показано, что создание защитного покрытия из мальтодекстрина с толщиной 4 и 6 мкм позволяет сохранить протеолитическую активность ферментов более 6 месяцев хранения при температуре 0–2 °С. Экспериментальным путем доказана эффективность применения микрокапсулированного двухкомпонентного ферментного препарата в технологии тендеризации ветчинных изделий. Под действием микрокапсулированного двухкомпонентного ферментного препарата, хранившегося более 6 месяцев, pH мяса после 36 ч ферментации увеличивается

на 7,3 %, водосвязывающая способность – на 8,5 %, влагоудерживающая способность – на 5,4 %, азот саркоплазматических белков к общему азоту – на 10,0 %, азот миофибриллярных белков к общему азоту – на 5,6 %, небелковый азот к общему азоту – на 4,8 %, полипептидный азот к общему азоту – на 3,3 %, напряжение среза ветчинных изделий уменьшается на 31,4 %. Также изменяется микроструктура: миофибриллы частично разрушены, отмечается выход ядер клеток в межклеточное пространство. Достоверных изменений показателей гидролиза белка под действием немикрокапсулированных ферментов папаина и пепсина, хранившихся более 6 месяцев, не отмечено.

Пептиды, выделенные из *Pleurotus ostreatus* (РОРЕ) с помощью энзиматического гидролиза пепсином, способны ингибировать окисление липидов и восстанавливающую способность металлов. В эксперименте на лабораторных мышах показано, что введение внутрь РОРЕР-III повышает активность супероксиддисмутазы в печени с $187,49 \pm 19,81$ до $233,35 \pm 34,23$ Ед/мг белка, глутатионпероксидазы (GSH-Px) с $84,01 \pm 14,54$ до $115,9 \pm 16,57$ Ед/мг белка ($P < 0,05$). Пептиды предотвращали вызванные введением CCl_4 окислительные гистологические изменения печени [19].

Пептид ACE-I, выделенный методом ультрафильтрации из ферментативного гидролизата мышечного белка *Oligodon woodmasoni*, снижает жизнеспособность клеток MCF-7 и обладает антиоксидантными свойствами [20]. Пептиды, полученные из морских источников, обладают противовоспалительным действием, что позволяет их использовать для лечения различных заболеваний, в частности желудочно-кишечного тракта, ревматоидного артрита и т. д. [21]. Пептиды, выделенные из белков животного происхождения, ингибируют активность ангиотензинпревращающего фермента, что позволяет использовать их для профилактики и лечения гипертонии [22, 23].

Одним из перспективных источников биологически активных пептидов является козье молоко. Гидролиз белков козьего молока осуществляют пепсином [24].

В исследовании R. J. S. de Castro и H. N. Sato предложена технология выделения пептидов из ферментативных гидролизатов изолятов соевого белка (SPI), сывороточного белка крупного рогатого скота (BWP) и яичного белка (EWP) с использованием Flavourzyme® 500L, индивидуально или в бинарных/тройных смесях [25]. Полученные пептиды характеризовались синергическим антимикробным эффектом в отношении *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 и задерживали рост бактерий на 19, 15 и ≥ 48 % соответственно.

L. Shafiei Kaleybar и др. с помощью программного обеспечения Hex 8.0.0. предсказаны противоопухолевые свойства бактериального

пептида SMANF2 на клеточных линиях A540 и HT-29 [26]. Результаты предсказали хорошие стереохимические, физико-химические и функциональные характеристики пептида SMANF2. Среди целевых белков клеточной линии A540 пептид SMANF2 показал самый высокий показатель стыковки – 539,12 кДж/моль с Bcl-2. С другой стороны, пептид показал самое высокое отрицательное значение E – 422,70 кДж/моль с Bcl-xL среди целевой линии клеток HT-29. Полученные данные свидетельствуют о противоопухолевых свойствах пептида SMANF2.

В исследовании K. Raja и др. выделены пептиды из сырой кожи морского сома (*Teuthis dussumieri*) и исследована их противоопухолевая эффективность на клеточной линии рака толстой кишки человека [27]. Фрагментация ДНК и результаты проточной цитометрии показали, что пептиды кожи морского сома индуцируют конденсацию хроматина и апоптотическую гибель клеток, а также нарушают клеточный цикл в фазе G_0/G_1 на линии клеток рака толстой кишки.

Широко известен тканевый иммуномодулятор глюкозаминилмурамилдипептид на основе пептидов. Он активизирует клетки иммунной системы *in vitro* и усиливает иммунный ответ на различные антигены, в том числе микробные. Глюкозаминилмурамилдипептид после проведения доклинических и клинических испытаний был зарегистрирован под названием Ликопид® [28].

Тканевый препарат на основе катионного изо пептида ϵ -поли-L-лизин (ϵ -PL) производится из незаменимой аминокислоты L-лизина и проявляет антимикробную активность против широкого спектра бактерий, дрожжей и грибов, нацеливаясь на клеточную мембрану. Является термостабильным и активным в различных пищевых матрицах [20].

Одним из перспективных источников биологически активных пептидов считается сумка Фабрициуса (фабрициева сумка или бурса). Это центральный орган иммунной системы у птиц, которая расположена на дорсальной поверхности клоаки, являясь ее дивертикулом. Этот лимфоэпителиальный орган состоит из долек с корковым и мозговым слоями. Среди эпителиальных клеток и ретикулоцитов бурсы располагаются большие и малые лимфоциты в виде плотных слоев. В дальнейшем из больших и малых лимфоцитов формируются плазматические клетки, синтезирующие антитела. Лимфоциты бурсы, являющиеся предшественниками плазмоцитов, получили название В-клеток. У млекопитающих созревание В-лимфоцитов происходит в костном мозге. Удаление бурсы у птиц приводит к угнетению биосинтеза антител. Экстракты бурс кур содержат биологически активные вещества, обладающие иммуностимулирующей активностью. Выделено 20 фракций из тимуса и ткани бурсы кур. Результаты исследования показали, что тимус и бурса имеют

аналогичный состав белковых веществ [29]. Из бурсы получен иммунологически активный препарат пептидной природы. Установлено, что в системе *in vivo* и *in vitro* биологическая активность препарата направлена на усиление иммунологической реактивности [30].

Пептид BP5, выделенный из бурсы, эффективно подавляет маркеры окислительного стресса, включая оксид азота (NO), активные формы кислорода (АФК), перекисное окисление липидов и окисление белков, снижает экспрессию и активность индуцибельной синтазы оксида азота (iNOS) и способствует защитному антиоксидантному состоянию, активируя экспрессию и активность некоторых ключевых антиоксидантных и окислительно-восстановительных ферментов, включая глутатионпероксидазу (GPx), глутатионредуктазу (GR), супероксиддисмутазу (SOD) и каталазу (CAT). Этот подавляющий эффект на окислительный стресс сопровождается пониженной регулируемой экспрессией и активностью ядерного фактора каппа В (NF-κB) [31].

Пептид BP5, выделенный из фабрициевой сумки, стимулирует экспрессию белка p53 в клетках рака толстой кишки HCT116. Он обладает сильным ингибирующим действием на рост клеток и индуцирует апоптоз в клетках HCT116. BP5 останавливает клеточный цикл в фазе G1, увеличивая экспрессию p53 и p21 и уменьшая экспрессию комплекса циклина E1-CDK2. Лечение онкологических заболеваний с помощью пептида BP5 активирует стресс-опосредованный апоптотический путь эндоплазматического ретикулума (ER). Об этом свидетельствует усиление экспрессии сенсоров развернутого белкового ответа (UPR) (IRE1a, ATF6, PERK) и нижестоящих сигнальных молекул (XBP-1s, eIF2a, ATF4 и CHOP), а также изменение фенотипических изменений, индуцированных BP5 в нокдаунных клетках IRE1, ATF6 и PERK. Кроме того, вызванный BP5 стресс ER сопровождался накоплением цитозольного свободного Ca²⁺ и внутриклеточного АФК. Применение BP5 приводит к увеличению экспрессии Bax, снижению экспрессии Bcl-2 и уменьшению δm . Это вызывает высвобождение цитохрома из митохондрий в цитоплазму и усиливает активность каспаз-9 и 3. Следовательно, BP5 обладает противоопухолевой способностью останавливать клеточный цикл в фазе G1 и вызывать ER-стресс/митохондриально-опосредованный каспазозависимый апоптоз в клетках HCT116 [32].

H. Ahangari и др. изучено применение различных протеаз для получения биоактивных пептидов из универсальных источников белка [33]. Всестороннее знакомство с различными типами протеаз, методами их производства и очистки может помочь исследователям определить новые протеазы с улучшенными свойствами, учитывая ежегодный рост рынка.

В патенте KR №1020080034712 описан способ получения ферментированной соевой композиции для получения пептида, имеющего высокую ACE-ингибирующую активность, путем ферментации соевых бобов при высокой температуре в течение короткого срока. Данная композиция содержит в своем составе пептиды низкомолекулярной массы, а также обладает антиокислительными, противогрибковыми и противоопухолевыми свойствами [34, 35].

Целью исследования является выделение пептидов из фабрициевой сумки и оценка их иммуноотропного действия на мышах различных линий с экспериментальным иммунодефицитом путем изучения морфофункционального состояния органов иммунопоза (тимус и селезенка).

Объекты и методы исследования

Оценку степени гидролиза белка фабрициевой сумки проводили по содержанию аминного азота (ГОСТ Р 55479-2013). Для выделения пептидов из ферментативного гидролизата фабрициевой сумки цыплят-бройлеров использовали мембраны с проницаемостью до 43 кДа. Это связано с исследованием S. M. Martínez и др., в котором установлено, что выраженным иммуномодулирующим свойством обладают короткие пептиды с молекулярной массой менее 43 кДа [36].

Молекулярно-массовое распределение белков и пептидов оценивали с помощью электрофореза в полиакриламидом геле в присутствии додецилсульфата натрия по методу Лэммли. Для разделения белка использовали денатурирующий полиакриламидный гель (12 % разделяющий и 4 % фокусирующий) с 0,1 % SDS-Na. Гельэлектрофорез проводили на однократном электродном буфере с добавлением 0,1 % SDS-Na при 15 мА. Гель окрашивали 0,2 % Кумасси R250 (приготовленного на ледяной уксусной кислоте) при повышенной температуре в течение 7–10 мин. Затем трижды отмывали дистиллированной водой. Просмотр и фотографирование гелей проводили на УФ-трансиллюминаторе при длине волны излучения 312 нм. Сохранение и обработку данных осуществляли с помощью гельдокументирующей системы Vitran-Photo.

Оценку иммуноотропных свойств бурсальных пептидов проводили с помощью модели экспериментального иммунодефицита.

Работа выполнена на мышах-самцах линий С3Н, С57BL/6, С57BL/10 и SJL 3-х месячного возраста, содержащихся в стандартных условиях вивария. Все манипуляции с животными были осуществлены в соответствии с Директивой Совета ЕС 2010/63/EU и одобрены этическим комитетом ИИФ УрО РАН. Экспериментальный иммунодефицит моделировался путем введения однократно и внутрибрюшинно циклофосфида (Эндоксан®, Бакстер Онкология ГмбХ, Германия) в дозе 200 мг/кг

массы тела животного в виде раствора со стерильным хлоридом натрия 0,9 % в концентрации 20 мг/мл. Контрольной группе мышей этих же линий вводился физиологический раствор хлорида натрия 0,9 % в аналогичном объеме. Для расчета дозы препарата проводился замер массы животных до воздействия.

Пептиды вводили на протяжении 7 дней после инъекции циклофосамида, разведенной в 0,1 мл 0,9 % раствора хлорида натрия, внутривентриально в дозе 0,1 мг/20 г массы животного. Контрольная группа мышей получала физиологический раствор хлорида натрия 0,9 % в аналогичном объеме. Мыши выводились из эксперимента на 8 сутки после моделирования иммунодефицита под наркозом (за 15–20 мин до эвтаназии вводился 2 % Ксилазин (1 мл/кг) и Золетил-100 (0,3 мл/кг) внутримышечно).

Для гистологического исследований проводили забор тимуса и селезенки.

Образцы тимуса и селезенки фиксировали в 10 % забуференном формалине 24–48 ч. Гистологическую проводку материала осуществляли при помощи автоматического тканевого процессора Leica TP1020. Материал обезживали в спиртах возрастающей концентрации и подвергали действию ксилола с последующей пропиткой парафином. Заливку образцов органов в парафин проводили при помощи станции заливки Leica EG1160. Готовые парафиновые блоки были использованы на следующих этапах работы для гистологического исследования.

Парафиновые срезы тимуса и селезенки толщиной 3–5 мкм окрашивали гематоксилином и эозином. Иммуногистохимическое окрашивание применялось для идентификации CD45⁺ (пан-лейкоцитарный маркер), CD20 (маркер В-лимфоцитов) и CD3 (маркер Т-лимфоцитов) клеток в тимусе и селезенке экспериментальных животных. В исследовании использовались антитела, приведенные в таблице 1.

При изготовлении срезов тканей для ИГХ-окрашивания использовали предметные стекла с адгезивной поверхностью Snowcoat X-tra (Leica Biosystems, США). Срезы подсушивали и подвергали депарафинизации, регидратации и промывке в PBS-Tween 20 (фосфатно-солевой буфер, pH = 7,2–7,4).

Антигенные детерминанты после формалиновой фиксации оказываются недоступными для антител из-за образования дополнительных сшивок между участками белков. Поэтому по рекомендации производителя перед ИГХ-окрашиванием необходимо проводить демаскировку антигенов. В данном исследовании, основываясь на рекомендациях производителя антител к CD3, применялась ферментативная (трипсиновая) демаскировка. Для этого использовали 0,05 % раствор трипсина (Sigma-Aldrich, Inc.) в дистиллированной воде с добавлением 1 % раствора хлорида кальция. Перед инкубацией с раствором трипсина срезы стекла со срезами нагревали до 37 °С в дистиллированной воде в термостате. Далее на срезы наносили раствор трипсина и помещали их во влажную камеру. Инкубацию с трипсином проводили при 37 °С в течение 15 мин, после чего срезы промывали в холодной дистиллированной воде с целью остановить ферментативную реакцию. Затем осуществляли промывку в PBS-Tween 20.

Дальнейшая процедура окрашивания одинакова для всех идентифицируемых антигенов. Идентификация антигенных детерминант осуществлялась непрямой пероксидазным методом окрашивания.

Срезы инкубировали с соответствующими первичными антителами при температуре 37 °С в течение 1 ч во влажной камере, после чего промывали дважды в PBS-Tween 20. Затем производили блокировку эндогенной пероксидазы с использованием коммерческого блокирующего раствора Peroxidase Block (Novocastra, Великобритания) и промывку в двух сменах PBS-Tween 20. Далее инкубировали срезы с соответствующими вторичными антителами при температуре 37 °С в течение 30 мин во влажной камере, после чего промывали дважды в PBS-Tween 20. Для визуализации антигенреактивных клеток использовали тест-систему Novolink Polymer Detection System (Novocastra, Великобритания). Антигенреактивные клетки контрастировали хромогенным субстратом (3,3-диаминобензидин в буферном растворе). DAB-позитивные клетки тимуса и селезенки идентифицировали по коричневому гранулярному окрашиванию цитоплазмы. Проводили

Таблица 1. Перечень антител для исследования

Table 1. Antibodies

Изучаемый антиген	Первичное антитело: клон, разведение, производитель	Вторичное антитело: клон, разведение, производитель
CD45	CD45 Polyclonal Antibody, 1:100, PA5-96061, Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, США	Goat anti-Rabbit IgG (H+L) Secondary Antibody, Biotin, поликлональное, 1:1000, 65-6140, Thermo Fisher Scientific, США
CD20	CD20 Polyclonal Antibody, 1:300, PA5-16701, Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, США	
CD3	Anti-CD3, T Cell antibody produced in rabbit, polyclonal, 1:200, C7930, Sigma-Aldrich, Merck, США	

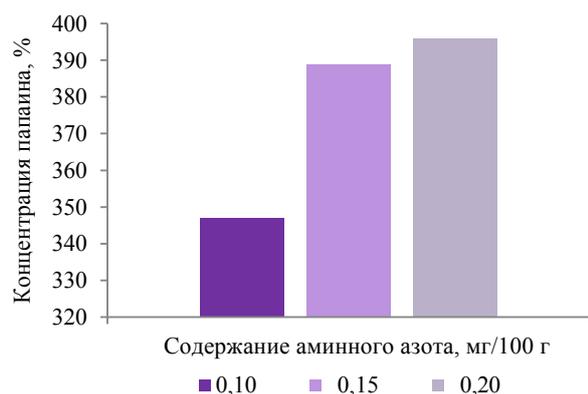


Рисунок 1. Содержание аминного азота в гидролизате фабрициевой сумки при разных концентрациях папаина

Figure 1. Amine nitrogen in the bursa fabricii hydrolysate at different concentrations of papain

постановку позитивного тканевого контроля и негативного контроля на тех же срезах исследуемой группы.

Анализ изображений проводили на микроскопе марки Leica DM2500 с видеокамерой Leica DFC420. Оценка исследуемых показателей проводилась с помощью пакета прикладных морфометрических программ ВидеоТесТ-Морфология 5.0. На гистологических препаратах определяли площадь мозгового и коркового вещества (тимус), соотношение красной и белой пульпы (селезенка), общую клеточность тимуса и селезенки с последующим пересчетом данных на 1 мм². Морфометрию зон фолликулов селезенки (площади реактивного центра, мантийной зоны, маргинальной (краевой) зоны) проводили по всей площади препарата, данные представлены в мкм². Оценка морфометрических показателей и подсчет количества CD45⁺, CD20⁺ и CD3⁺ клеток производили при увеличении объектива микроскопа 40× в 10 полях зрения. На основе полученных данных производили подсчет среднеарифметических значений, которые подвергали статистической обработке.

Анализ данных выполнен в пакете статистических программ STATISTICA 6.0 (StatSoft, Inc. 2001). Данные представлены в виде среднего арифметического $M \pm$ стандартная ошибка среднего m . Для проверки гипотезы об однородности двух независимых выборок использовали непараметрический критерий Манна-Уитни (Mann-Whitney Utest). При проверке статистических гипотез использовали 5 % уровень значимости.

Результаты и их обсуждение

Технология гидролиза белков фабрициевой сумки и выделения пептидов включала следующие этапы: промывка сырья проточной водой в течение

10 мин при температуре 16–18 °С; измельчение на лабораторной мельнице в течение 3 мин при частоте вращения ножей 2400 об/мин; гомогенизация при скорости вращения насадки 600 об/мин при температуре 4 °С в течение 60 мин; смешивание с дистиллированной водой в соотношении 1:1, 1:3 и 1:5; нагревание до температуры оптимума активности фермента Papain (КФ 3.4.22.2) (36 °С); внесение фермента, растворенного в фосфатно-буферном растворе с pH 6,0, гидролиз в течение 6 ч. Для получения гидролизата в качестве фермента был выбран папаин из-за его действия на белки фабрициевой сумки. В результате этого продуктами гидролиза являются пептиды и аминокислоты. Также учитывался оптимум активности фермента – pH 6,0, что соответствует pH сырья.

Эффективность гидролиза оценивали по содержанию аминного азота в гидролизате.

Для определения оптимальной дозировки папаина и продолжительности процесса гидролиза сырье обрабатывали ферментным препаратом в количестве 0,10, 0,15 и 0,20 % к массе. Контроль процесса осуществляли по накоплению в среде аминного азота, отбор проб проводили 1 раз в час. Содержание аминного азота в гидролизате фабрициевой сумки при разных концентрациях папаина приведено на рисунке 1.

Наилучшие результаты получены при концентрациях папаина, растворенного в фосфатно-буферном растворе, 0,15 и 0,20 % к основному сырью (фабрициева сумка). Содержание аминного азота в гидролизате фабрициевой сумки при концентрации папаина 0,15 % к основному сырью составляет 389 мг/100 г. Это выше на 18 % по сравнению с концентрацией папаина 0,10 % от массы сырья. При повышении концентрации папаина до 0,20 % отмечается тенденция к увеличению образования аминного азота – 396 мг/100 г.

Следовательно, целесообразно использовать для гидролиза фабрициевой сумки концентрацию папаина 0,15 %. Бурсальные пептиды (BP5 и BP11) с молекулярной массой 28–18 кДа обладают наибольшей биологической активностью, стимулируют выработку антител и предупреждают иммунодефицитное состояние, что установлено в исследованиях [31, 32].

В исследовании L. Xiao и др. доказано, что бурсальный пептид (BP11) с молекулярной массой 16–28 кДа регулирует дифференцировку В-клеток, в том числе увеличивает процент незрелых и зрелых В-клеток в БМ-клетках, совместно культивируемых с IL-7 [37]. BP11 оказывает иммуномодулирующее действие на антигенспецифические иммунные реакции у мышей BALB/c, иммунизированных вакциной с инактивированным вирусом влияния (AIV, подтип H9N2), включая усиление продукции AIV-специфических антител и цитокинов. BP11

Таблица 2. Относительное содержание молекулярного распределения фракций ферментативного гидролизата фабрициевой сумки, %

Table 2. Molecular distribution of fractions of the enzymatic bursa fabricii hydrolyzate, %

Молекулярная масса, кДа	Концентрация папаина, %		
	0,10	0,15	0,20
30–27	22	9	29
27–18	62	73	57
Менее 18	16	18	14

Таблица 4. Относительное содержание молекулярного распределения фракций пептидов из ферментативного гидролизата фабрициевой сумки при разном гидромодуле, %

Table 4. Molecular distribution of peptide fractions of the enzymatic bursa fabricii hydrolyzate at different hydraulic modules, %

Молекулярная масса, кДа	Гидромодуль		
	1:1	1:3	1:5
30–27	38	8	47
27–18	52	78	41
Менее 18	10	14	12

стимулирует выработку антител. Следовательно, BP11 важен для развития иммунной системы.

Y. Yin и др. установлено, что BP11 препятствует морфологическим изменениям и ослабляет экспрессию фенотипических маркеров (молекул МНС II, CD40, CD80 и CD86) в ЛПС-индуцированных ДК [38]. BP5 восстанавливает сниженное поглощение FITC-декстрана в обработанных ЛПС ДК. Следовательно, применение BP5 профилактирует иммунодефицитное состояние путем отмены иммунной функции DCs.

В таблице 2 представлено относительное содержание молекулярного распределения фракций пептидов из ферментативного гидролизата фабрициевой сумки при гидромодуле 1:3, температуре 35 °С и времени гидролиза 6 ч в зависимости от концентрации папаина 0,10–0,20 % к основному сырью.

Из данных таблицы 2 следует, что молекулярная масса пептидов из ферментативного гидролизата фабрициевой сумки распределяется в разных значениях и зависит от концентрации папаина. При концентрации 0,15 % папаина молекулярная масса пептидов составила от 27 до 18 кДа (73 %). При концентрации 0,10 и 0,20 % папаина процентное отношение фракций белка составило 62 и 57 % соответственно. Следовательно, наиболее эффективным для получения ферментативного гидролизата фабрициевой сумки является использование 0,15 % концентрации папаина при гидролизе сырья.

Таблица 3. Относительное содержание молекулярного распределения фракций пептидов из ферментативного гидролизата фабрициевой сумки, %

Table 3. Molecular distribution of peptide fractions of the enzymatic bursa fabricii hydrolyzate, %

Молекулярная масса, кДа	Температура гидролиза, °С		
	35	36	37
30–27	16	5	20
27–18	63	85	67
Менее 18	21	10	13

Таблица 5. Относительное содержание молекулярного распределения фракций пептидов из ферментативного гидролизата фабрициевой сумки в зависимости от времени гидролиза, %

Table 5. Molecular distribution of peptide fractions of the enzymatic bursa fabricii hydrolyzate at hydrolysis time, %

Молекулярная масса, кДа	Время гидролиза, ч		
	4	6	8
30–27	17	11	36
27–18	75	82	56
Менее 18	8	7	9

В таблице 3 представлено молекулярное распределение фракций пептидов из ферментативного гидролизата фабрициевой сумки при 0,15 % концентрации папаина, гидромодуле 1:3 и времени гидролиза 6 ч в зависимости от температуры гидролиза.

Из данных таблицы 3 следует, что температура гидролиза оказывает влияние на распределение молекулярной массы фракций пептидов из ферментативного гидролизата фабрициевой сумки. При температуре 36 °С количество ферментативного гидролизата в процентном отношении с молекулярной массой от 27 до 18 кДа было максимальным и составило 85 %, при температуре 35 и 37 °С – 63 и 67 % соответственно. Следовательно, целесообразно проводить гидролиз сырья для выделения получения фракций с молекулярной массой 23–36 кДа при температуре 36 °С.

В таблице 4 представлено относительное содержание молекулярного распределения фракций пептидов из ферментативного гидролизата фабрициевой сумки при 0,15 % концентрации папаина, температуры гидролиза 36 °С и времени гидролиза 6 ч в зависимости от гидромодуля.

Изменение гидромодуля при гидролизе сырья оказало влияние на распределение молекулярной массы ферментативного гидролизата фабрициевой сумки. Наибольшее количество пептидов ферментативного гидролизата фабрициевой сумки с молекулярной массой 27–18 кДа отмечено при

Таблица 6. Соотношение мозгового и коркового вещества тимуса

Table 6. Medulla vs. cortex of the thymus

Линия	Группа	S мозгового вещества, мм ²	S коркового вещества, мм ²	S мозгового вещества/S коркового вещества
СЗН	Контроль	0,431 ± 0,114	0,850 ± 0,114	0,518 ± 0,132
	Бурсальные пептиды	0,272 ± 0,070	0,589 ± 0,137	0,442 ± 0,052
С57BL/6	Контроль	0,612 ± 0,128	2,701 ± 0,584	0,381 ± 0,186
	Бурсальные пептиды	0,626 ± 0,124	3,514 ± 0,524	0,175 ± 0,017
С57BL/10	Контроль	0,292 ± 0,081	1,474 ± 0,360	0,169 ± 0,027
	Бурсальные пептиды	0,348 ± 0,147	1,397 ± 0,465	0,195 ± 0,064
SJL	Контроль	0,208 ± 0,027	1,355 ± 0,068	0,163 ± 0,031
	Бурсальные пептиды	0,153 ± 0,043	0,389 ± 0,091*	0,479 ± 0,087*

* Различия с контролем достоверны ($P < 0,05$).

* Differences are significant at $P < 0.05$.

Таблица 7. Плотность распределения CD-45⁺ клеток в мозговом и корковом веществе тимусаTable 7. Distribution density of CD-45⁺ cells in the thymus medulla and cortex

Линия	Группа	CD-45 ⁺ клетки в 1 мм ² коркового вещества	CD-45 ⁺ клетки в 1 мм ² мозгового вещества
СЗН	Контроль	109734 ± 6356	76091 ± 2738
	Бурсальные пептиды	102740 ± 8245	73818 ± 4473
С57BL/6	Контроль	112504 ± 8525	87595 ± 2113
	Бурсальные пептиды	129980 ± 6985	83470 ± 1586
С57BL/10	Контроль	117600 ± 5481	79153 ± 1898
	Бурсальные пептиды	116360 ± 6558	72227 ± 3418
SJL	Контроль	134802 ± 5261	88618 ± 1760
	Бурсальные пептиды	116116 ± 8861	80428 ± 7519

гидромуле 1:3 и составило 78 %, при гидромуле 1:1 и 1:5 – 52 и 41 % соответственно.

Таким образом, наиболее эффективно проводить гидролиз сырья при соотношении фабрициева сумка:дистиллированная вода 1:3.

В таблице 5 представлено относительное содержание молекулярного распределения фракций ферментативного гидролизата фабрициевой сумки при 0,15 % концентрации папаина, температуре 36 °С и гидромуле 1:3 в зависимости от времени гидролиза сырья.

Из данных таблицы 5 следует, что максимальное процентное содержание пептидов их ферментативного гидролизата фабрициевой сумки с молекулярной массой 27–18 % отмечается при времени гидролиза сырья 6 ч и составляет 82 %, при 4 и 8 ч – 75 и 56 % соответственно.

Представленная технология гидролиза фабрициевой сумки позволяет выделить пептиды ВР5 и ВР11 с молекулярной массой 27–18 кДа. По данным [37, 39] указанные пептиды регулируют дифференциацию В-клеток, активизирующих выработку антител и неспецифический иммунный ответ.

Проведенная оценка морфометрических изменений в тимусе не выявила значительного изменения

площади коркового и мозгового вещества тимуса у мышей линий СЗН, С57BL/6 и С57BL/10 после введения пептидов. Только у иммунодефицитных мышей линии SJL на фоне введения пептидов отмечается снижение площади коркового вещества относительно контрольной группы (табл. 6). Это может свидетельствовать о снижении лимфоцитопозитивской функции, подавлении митотической активности клеток, что является стереотипным ответом тимуса на различные стрессорные и антигенные воздействия. Корковое вещество тимуса активнее отвечает на различные воздействия, чем мозговое, которое является более стабильной зоной тимуса. Корково-мозговое соотношение в тимусе позвоночных определяет процессы, связанные с пролиферацией, созреванием и рециркуляцией лимфоцитов.

Данные иммуногистохимического исследования тимуса не выявили значимых изменений содержания CD45⁺ и CD3⁺ клеток в корковом и мозговом веществе из расчета на единицу площади (табл. 7 и 8). Таким образом, бурсальные пептиды не вызывают относительного снижения общей клеточности тимуса в корковом и мозговом веществе.

В корковом веществе тимуса мышей линии SJL отмечается снижение содержания CD3⁺ клеток. Это

Таблица 8. Плотность распределения CD3⁺ клеток в мозговом и корковом веществе тимусаTable 8. Distribution density of CD3⁺ cells in the thymus medulla and cortex

Линия	Группа	CD3 ⁺ клетки в 1 мм ² коркового вещества	CD3 ⁺ клетки в 1 мм ² мозгового вещества
C3H	Контроль	24104,98 ± 1967,59	15298,73 ± 668,79
	Бурсальные пептиды	21025,19 ± 1221,71	14893,36 ± 856,32
C57BL/6	Контроль	5312,83 ± 738,60	6315,93 ± 1504,53
	Бурсальные пептиды	4267,11 ± 790,96	11648,75 ± 2263,74
C57BL/10	Контроль	26405,11 ± 1812,26	27436,39 ± 601,70
	Бурсальные пептиды	23012,43 ± 1004,94	14960,80 ± 1517,91*
SJL	Контроль	29763,96 ± 1311,54	19809,75 ± 2756,67
	Бурсальные пептиды	17777,05 ± 1003,71*	17558,58 ± 770,34

* Различия с контролем достоверны ($P < 0,05$).

* Differences are significant at $P < 0.05$.

Таблица 9. Характеристика красной и белой пульпы селезенки экспериментальных групп

Table 9. Red and white spleen pulp in the experimental groups

Линия	Группа	S белой пульпы, мм ²	S красной пульпы, мм ²	S белой пульпы/ S красной пульпы	Количество лимфоидных фолликулов/ 1 мм ² паренхимы
C3H	Контроль	0,729 ± 0,059	5,366 ± 0,715	0,135 ± 0,007	1,413 ± 0,209
	Бурсальные пептиды	0,603 ± 0,077	5,943 ± 0,317	0,103 ± 0,013	1,606 ± 0,125
C57BL/6	Контроль	1,271 ± 0,097	6,467 ± 0,081	0,303 ± 0,031	2,088 ± 0,120
	Бурсальные пептиды	1,453 ± 0,098	5,503 ± 0,202*	0,267 ± 0,026	2,230 ± 0,165
C57BL/10	Контроль	2,147 ± 0,610	4,604 ± 0,466	0,576 ± 0,236	2,504 ± 0,616
	Бурсальные пептиды	1,997 ± 0,406	4,139 ± 0,552	0,569 ± 0,169	2,418 ± 0,366
SJL	Контроль	0,276 ± 0,075	5,336 ± 0,623	0,063 ± 0,025	0,725 ± 0,189
	Бурсальные пептиды	0,941 ± 0,163*	6,839 ± 0,253	0,139 ± 0,024	1,226 ± 0,227

* Различия с контролем достоверны ($P < 0,05$).

* Differences are significant at $P < 0.05$.

можно трактовать как преходящее снижение скорости созревания Т-лимфоцитов у данной линии мышей в ответ на введение бурсальных пептидов. Кроме того, у мышей линии C57BL/10 отмечается снижение числа CD3⁺ клеток в мозговом веществе тимуса в экспериментальной группе, что также указывает на угнетение процессов созревания Т-лимфоцитов. Проведенные исследования свидетельствуют о том, что в ответ на введение бурсальных пептидов у мышей линии C3H достоверных изменений морфометрических показателей селезенки не отмечается (табл. 9). При этом содержание CD3⁺ клеток в белой и красной пульпе снижается, что может свидетельствовать об угнетении созревания Т-лимфоцитов.

У мышей линии C57BL/6 с ЦФА-индуцированным иммунодефицитом после введения бурсальных пептидов определяется достоверное снижение площади красной пульпы в единице площади (табл. 9). Также в белой пульпе мышей данной линии отмечается уменьшение площади реактивного

центра, по сравнению с контролем (табл. 10), при значительном повышении количества CD3⁺ клеток в красной и белой пульпе (табл. 10).

У иммунодефицитных мышей линии C57BL/10 после введения бурсальных пептидов отмечается увеличение площади реактивного центра в белой пульпе селезенки (табл. 10). Это указывает на активацию антиген-зависимой пролиферации и дифференцировки В-лимфоцитов. При этом количество CD45⁺ и CD3⁺ клеток в белой и красной пульпе не меняется (табл. 11 и 12).

Проведенные исследования установили, что у мышей линии SJL введение бурсальных пептидов после индукции иммунодефицита вызывает повышение площади белой пульпы по сравнению с группой контроля (табл. 9).

Иммуногистохимическое окрашивание на CD20 тимуса и селезенки мышей различных линий не выявило позитивно-окрашенных клеток ни в одной из групп животных. Принимая во внимание позитивное окрашивание в контрольной ткани

Таблица 10. Морфометрия зон лимфоидных узелков селезенки

Table 10. Morphometry of spleen lymphoid nodules

Линия	Группа	S реактивного центра, мкм ²	S мантийной зоны, мкм ²	S краевой зоны, мкм ²
СЗН	Контроль	8493 ± 1532	44478 ± 4694	29989 ± 5695
	Бурсальные пептиды	7474 ± 649	37679 ± 5247	18605 ± 2047
С57BL/6	Контроль	8493 ± 1532	44478 ± 4694	21795 ± 2377
	Бурсальные пептиды	3475 ± 333*	36447 ± 2681	23768 ± 3909
С57BL/10	Контроль	5160 ± 485	51260 ± 8860	39063 ± 6487
	Бурсальные пептиды	9362 ± 381*	82318 ± 9172	53587 ± 8485
SJL	Контроль	4586 ± 1805	13509 ± 4024	11158 ± 4535
	Бурсальные пептиды	5046 ± 580	33705 ± 8990	19836 ± 4462

* Различия с контролем достоверны ($P < 0,05$).

* Differences are significant at $P < 0.05$.

Таблица 11. Плотность распределения CD-45⁺ клеток в красной и белой пульпе селезенкиTable 11. Distribution density of CD-45⁺ cells in the red and white spleen pulp

Линия	Группа	CD-45 ⁺ клетки в 1 мм ² красной пульпы	CD-45 ⁺ клетки в 1 мм ² белой пульпы
СЗН	Контроль	55649 ± 2391	73258 ± 3076
	Бурсальные пептиды	62653 ± 3151	70156 ± 1393
С57BL/6	Контроль	74978 ± 3609	85269 ± 4780
	Бурсальные пептиды	74871 ± 8815	89391 ± 2937
С57BL/10	Контроль	72377 ± 5503	66610 ± 2870
	Бурсальные пептиды	65660 ± 2644	64485 ± 3264
SJL	Контроль	55649 ± 2391	76308 ± 5433
	Бурсальные пептиды	54773 ± 4309	64851 ± 2822

* Различия с контролем достоверны ($P < 0,05$).

* Differences are significant at $P < 0.05$.

Таблица 12. Плотность распределения CD3⁺ клеток в белой и красной пульпе селезенкиTable 12. Distribution density of CD3⁺ cells in the red and white spleen pulp

Линия	Группа	CD3 ⁺ клетки в 1 мм ² красной пульпы	CD3 ⁺ клетки в 1 мм ² белой пульпы
СЗН	Контроль	8631,08 ± 617,54	32479,66 ± 557,87
	Бурсальные пептиды	5036,93 ± 644,68*	19206,88 ± 2151,64*
С57BL/6	Контроль	2667,30 ± 398,51	2873,16 ± 851,03
	Бурсальные пептиды	11435,77 ± 816,86*	27924,50 ± 3418,57*
С57BL/10	Контроль	9542,91 ± 605,16	28427,09 ± 1218,18
	Бурсальные пептиды	10004,49 ± 386,81	21332,01 ± 2705,62
SJL	Контроль	4774,77 ± 617,44	25365,99 ± 2715,59
	Бурсальные пептиды	3491,49 ± 333,46	28718,93 ± 1399,39

* Различия с контролем достоверны ($P < 0,05$).

* Differences are significant at $P < 0.05$.

с использованием того же перечня реагентов, а также иммунореактивность мышей для данного вида антител, гарантированную производителем, можно предположить, что введение циклофосфида могло вызвать исчезновение CD20⁺ клеток в тимусе и селезенке исследуемых мышей. Красная пульпа

селезенки и В-зависимые зоны более активно запусевают в ответ на введение циклофосфида, а Т-зависимые области остаются интактными. Введение ЦФА до антигенного стимула длительно подавляет образование антител, но не влияет на предшествующие активированные Т-клетки. Выявленный факт

требует проведения дополнительных исследований с возможной заменой определяемого маркера В-лимфоцитов и проверкой используемого первичного антитела в других группах и тканях.

Обращают на себя внимание ученых особенности реакции на введение бурсальных пептидов у разных линий мышей. Сочетание с различной чувствительностью исследуемых линий мышей на введение циклофосамида, отмечаемой в работах различных авторов и наших предварительных исследованиях, затрудняет выявление общих закономерностей иммуотропного действия исследуемых пептидов. Резкого снижения или роста показателей в ответ на введение бурсальных пептидов не отмечается. Иммуноцитотоксические эффекты отсутствуют. Большинство показателей не отличается от контрольных значений. В случае выраженных отличий показателей от контрольной группы представляет интерес оценка восстановительных процессов в динамике.

Выводы

Разработана технология получения коротких пептидов с молекулярной массой 28–18 кДа из ферментативного гидролизата фабрициевой сумки цыплят-бройлеров, включающая промывку сырья, измельчение, гомогенизацию, гидролиз и ультрафильтрацию. Эффективность гидролиза определена по содержанию аминного азота в гидролизате. Установлена рациональная концентрация фермента папаина – 0,15 % от массы сырья. Определены рациональные технологические параметры гидролиза: концентрация папаина 0,15 %, температура 36 °С, гидромодуль 1:3, время гидролиза 6 ч. На основании гистологических исследований расчета площади мозгового и коркового вещества тимуса, соотношения красной и белой пульпы селезенки, общей клеточности тимуса и селезенки, морфометрии зон фолликулов селезенки и подсчета количества CD45⁺, CD20⁺ и CD3⁺ клеток

иммунодефицитных мышей доказано снижение иммуноцитотоксических эффектов на фоне введения внутрь пептидов в дозе 0,1 мг/20 г массы животного, разведенных в 0,1 мл 0,9 % раствора хлорида натрия.

Из проведенных исследований биологической активности выделенных пептидов с использованием экспериментально обоснованных технологических режимов ферментного гидролиза фабрициевой сумки следует, что полученные пептиды после проведения дополнительных исследований можно отнести к перспективным пищевым ингредиентам. Создание и внедрение в производство с использованием пептидов специализированных пищевых продуктов, включающих действующее начало, в виде пептидов формирует предпосылки для становления нового направления фармаконутрициологии, сочетающего не только профилактику и лечение болезней различной этиологии, но и изучение механизма развития патологических процессов. Это позволит определить необходимость применения тех или иных пептидов. Развитие указанного направления будет эффективным и безопасным методом сохранения здоровья человека.

Критерии авторства

Авторы в равной степени принимали участие в исследованиях и оформлении рукописи.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Contribution

All the authors contributed equally to the study and bear equal responsibility for information published in this article.

Conflict of interest

The authors declare that there is no conflict of interest regarding the publication of this article.

References/Список литературы

1. Kerksick CM, Arent S, Schoenfeld BJ, Stout JR, Campbell B, Wilborn CD, *et al.* International society of sports nutrition position stand: nutrient timing. *Journal of the International Society of Sports Nutrition*. 2017;14(1). <https://doi.org/10.1186/s12970-017-0189-4>
2. Banihashemi SA, Nikoo M, Ghasempour Z, Ehsani A. Bioactive peptides fractions from traditional Iranian Koopeh cheese; lactic fermentation products. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. 2020;29. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2020.101798>
3. Meinlschmidt P, Sussmann D, Schweiggert-Weisz U, Eisner P. Enzymatic treatment of soy protein isolates: effects on the potential allergenicity, technofunctionality, and sensory properties. *Food Science and Nutrition*. 2016;4(1):11–23. <https://doi.org/10.1002/fsn3.253>
4. Pak VV, Koo MS, Kasymova TD, Kwon DY. Isolation and identification of peptides from soy 11S-globulin with hypocholesterolemic activity. *Chemistry of Natural Compounds*. 2005;41(6):710–714. <https://doi.org/10.1007/s10600-006-0017-6>
5. Marques MR, Fontanari GG, Pimenta DC, Soares-Freitas RM, Arêas JAG. Proteolytic hydrolysis of cowpea proteins is able to release peptides with hypocholesterolemic activity. *Food Research International*. 2015;77:43–48. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.04.020>

6. Ashraf J, Liu L, Awais M, Xiao T, Wang L, Zhou X, et al. Effect of thermosonication pre-treatment on mung bean (*Vigna radiata*) and white kidney bean (*Phaseolus vulgaris*) proteins: Enzymatic hydrolysis, cholesterol lowering activity and structural characterization. *Ultrasonics Sonochemistry*. 2020;66. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2020.105121>
7. Soares RAM, Mendonça S, de Castro LÍA, Menezes ACCCC, Arêas JAG. Major peptides from amaranth (*Amaranthus cruentus*) protein inhibit HMG-CoA reductase activity. *International Journal of Molecular Sciences*. 2015;16(2):4150–4160. <https://doi.org/10.3390/ijms16024150>
8. Prados IM, Plaza M, Marina ML, García M. Concepción evaluation of the relationship between the peptide profile and the lipid-lowering properties of olive seeds hydrolysates as a tool for tuning hypocholesterolemic functionality. *Food and Function*. 2020;11(6):4973–4981. <https://doi.org/10.1039/d0fo00576b>
9. Tsai J-S, Chen T-J, Pan BS, Gong S-D, Chung M-Y. Antihypertensive effect of bioactive peptides produced by protease-facilitated lactic acid fermentation of milk. *Food Chemistry*. 2008;106(2):552–558. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.06.039>
10. Chen GW, Liao KJ. Method of combining pressure and enzyme to extract hydrolysate of animal-derived composition. Taiwan Patent No. TW1600379B. 2017.
11. Eisenmenger MJ, Reyes-De-Corcuera JI. High pressure enhancement of enzymes: A review. *Enzyme and Microbial Technology*. 2009;45(5):331–347. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2009.08.001>
12. Marciniak A, Suwal S, Naderi N, Pouliot Y, Doyen A. Enhancing enzymatic hydrolysis of food proteins and production of bioactive peptides using high hydrostatic pressure technology. *Trends in Food Science and Technology*. 2018;80:187–198. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.08.013>
13. Lin YH, Li CH, Lin CH, Yan YZ, Chuang YY, Chen GW. Application and development status of an ultra-high pressure processing technique in aquatic food. *Fish. Ext. Rep.* 2017;47:17–32.
14. Chen G-W, Yang M-H. Production and purification of novel hypocholesterolemic peptides from lactic fermented *Spirulina platensis* through high hydrostatic pressure-assisted protease hydrolysis. *Catalysts*. 2021;11(8). <https://doi.org/10.3390/catal11080873>
15. Anh TLQ, Hoa NTQ, Nguyen PDT, Van Thanh H, Nguyen PB, Anh LTH, et al. Soybean protein extraction by alcalase and flavourzyme, combining thermal pretreatment for enteral feeding product. *Catalysts*. 2020;10(8). <https://doi.org/10.3390/catal10080829>
16. Liu D-M, Chen J, Shi Y-P. Advances on methods and easy separated support materials for enzymes immobilization. *TrAC – Trends in Analytical Chemistry*. 2018;102:332–342. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2018.03.011>
17. Kudryashov LS, Uzakov YaM, Tikhonov SL, Tikhonova NV, Diachkova AV. Microencapsulation of proteolytic enzymes for industrial application. *News of the Academy of Sciences of the Republic of Kazakhstan. Series of Geology and Technical Sciences*. 2020;3(441):161–169. <https://doi.org/10.32014/2020.2518-170X.67>
18. Tikhonov SL, Tikhonova NV, Kudryashov LS, Kudryashova OA, Moskovenko NV, Tretyakova IN. Efficiency of Microencapsulation of Proteolytic Enzymes. *Catalysts*. 2021;11(11). <https://doi.org/10.3390/catal11111270>
19. Zhang L, Lu Y, Feng X, Liu Q, Li Y, Hao J, et al. Hepatoprotective effects of *Pleurotus ostreatus* protein hydrolysates yielded by pepsin hydrolysis. *Catalysts*. 2020;10(6). <https://doi.org/10.3390/catal10060595>
20. Joshi I, Janagaraj K, Noorani KPM, Nazeer RA. Isolation and characterization of angiotensin I-converting enzyme (ACE-I) inhibition and antioxidant peptide from by-catch shrimp (*Oratosquilla woodmasoni*) waste. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. 2020;29. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2020.101770>
21. Narayanasamy A, Balde A, Raghavender P, Shashanth D, Abraham J, Joshi I, et al. Isolation of marine crab (*Charybdis natator*) leg muscle peptide and its anti-inflammatory effects on macrophage cells. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. 2020;25. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2020.101577>
22. Villadóniga C, Cantera AMB. New ACE-inhibitory peptides derived from α -lactalbumin produced by hydrolysis with *Bromelia antiacantha* peptidases. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. 2019;20. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2019.101258>
23. El-Sayed ST, Al-Azzouny RA, Ali OS. Purification and functional characterization of a novel tyrosinase (diphenolase) inhibitory peptides prepared from *Solunum tuberosum* peels protein via enzymatic hydrolysis. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. 2019;17:331–338. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2018.12.009>
24. Rani S, Pooja K, Pal GK. Exploration of potential angiotensin converting enzyme inhibitory peptides generated from enzymatic hydrolysis of goat milk proteins. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. 2017;11:83–88. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2017.06.008>
25. de Castro RJS, Sato HH. Simultaneous hydrolysis of proteins from different sources to enhance their antibacterial properties through the synergistic action of bioactive peptides. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. 2016;8:209–212. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2016.09.014>
26. Shafiei Kaleybar L, Khoshfetrat AB, Nozad Charoudeh H. Modeling and performance prediction of a conceptual bioprocess for mass production of suspended stem cells. *Food and Bioprocess Processing*. 2020;122:254–268. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2020.04.012>

27. Raja K, Martin LC, Bose L, Sahayanathan GJ, Padmanaban D, Chinnasamy A. Anti-proliferative and apoptotic effects of by-product (skin extract) from marine catfish *Tachysurus dussumieri*. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. 2020;29. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2020.101816>
28. Immunotherapy: a guide for physicians. 2nd ed. In: Khaitov RM, Ataulakhanov RI, Shul'zhenko AE, editors. Moscow: GEHOTAR-Media; 2018. 767 p. (In Russ.).
- Иммунотерапия: руководство для врачей. 2-е изд. / под ред. Р. М. Хаитова, Р. И. Атауллаханова, А. Е. Шульженко. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2018. 767 с.
29. Xu Q, Hong H, Wu J, Yan X. Bioavailability of bioactive peptides derived from food proteins across the intestinal epithelial membrane: A review. *Trends in Food Science and Technology*. 2019;86:399–411. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.02.050>
30. Травникова НА. Comparative morphology of the bursa fabricii of broiler chickens in the age aspect and different conditions. Cand. sci. vet. diss. abstract. Yekaterinburg: Ural State Agrarian University; 2004. 22 p. (In Russ.).
- Травникова Н. А. Сравнительная морфология фабрициевой бурсы цыплят-бройлеров в возрастном аспекте при разных способах содержания: автореф. дис...канд. вет. наук. Екатеринбург, 2004. 22 с.
31. Li D, Xue M, Geng Z, Chen P. The suppressive effects of bursopentine (BP5) on oxidative stress and NF-κB activation in lipopolysaccharide-activated murine peritoneal macrophages. *Cellular Physiology and Biochemistry*. 2012;29:9–20. <https://doi.org/10.1159/000337581>
32. Li J, Li T-X, Ma Y, Zhang Y, Li D-Y, Xu H-R. Bursopentin (BP5) induces G1 phase cell cycle arrest and endoplasmic reticulum stress/mitochondria-mediated caspase-dependent apoptosis in human colon cancer HCT116 cells. *Cancer Cell International*. 2019;19(1). <https://doi.org/10.1186/s12935-019-0849-3>
33. Ahangari H, Yazdani P, Ebrahimi V, Soofiyan SR, Azargun R, Tarhriz V, *et al.* An Updated review on production of food derived bioactive peptides; focus on the psychotropic bacterial proteases. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. 2021;35. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2021.102051>
34. Dullius A, Goettert MI, de Souza CFV. Whey protein hydrolysates as a source of bioactive peptides for functional foods – Biotechnological facilitation of industrial scale-up. *Journal of Functional Foods*. 2018;42:58–74. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2017.12.063>
35. Martínez-Sánchez SM, Gabaldón-Hernández JA, Montoro-García S. Unravelling the molecular mechanisms associated with the role of food-derived bioactive peptides in promoting cardiovascular health. *Journal of Functional Foods*. 2020;64. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2019.103645>
36. Khaitov RM. Immunomodulators: myths and reality. *Immunologiya*. 2020;41(2):101–106. <https://doi.org/10.33029/0206-4952-2020-41-2-101-106>
37. Liu X-D, Feng X-L, Zhou B, Cao R-B, Li X-F, Ma Z-Y, *et al.* Isolation, modulatory functions on murine B cell development and antigen-specific immune responses of BP11, a novel peptide from the chicken bursa of Fabricius. *Peptides*. 2012;35(1):107–113. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2012.03.003>
38. Yin Y, Qin T, Yu Q, Yang Q. Bursopentin (BP5) from chicken bursa of fabricius attenuates the immune function of dendritic cells. *Amino Acids*. 2014;46(7):1763–1774. <https://doi.org/10.1007/s00726-014-1735-x>
39. Feng X-L, Zhou B, Cao R-B, Liu Q-T, Liu K, Liu X-D, *et al.* Immunomodulatory roles and functional analysis of pre-B lymphocyte DT40 cells with the bursal-derived BSP-II treatment. *Peptides*. 2012;36(2):292–298. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2012.04.015>