

## PTASIE PRZECIWCIAŁA IgY - ZALETY I ZASTOSOWANIA

### AVIAN ANTIBODIES IgY – ADVANTAGES AND APPLICATIONS

Rafał BUKOWSKI, Piotr PODLASZ, Krzysztof WĄSOWICZ

Zespół Anatomii Zwierząt, Katedra Morfologii Funkcjonalnej,  
Wydziału Medycyny Weterynaryjnej, UWM, Olsztyn

*Streszczenie:* Ptasie przeciwciała IgY stanowią cenne, alternatywne w stosunku do przeciwciał IgG ssaków narzędzie w badaniach, diagnostyce i terapii. Zalety IgY wynikają z ich różnicy strukturalnej i odległości filogenetycznej od przeciwciał IgG. Ptasie immunoglobuliny są z sukcesem wykorzystywane w testach Western Blot, ELISA, immunoprecypitacji i immunohistochemii. Przeciwciała IgY pozwalają na terapię niektórych chorób bakteryjnych i wirusowych, gdy zawodzi leczenie konwencjonalne. Produkcja ptasich przeciwciał jest prosta, wydajna i mało inwazyjna, gdyż IgY izolowane są z żółtek kurzych jaj. Stosunkowo nieduże zainteresowanie ptasimi przeciwciałami jest wynikiem braku dostatecznej informacji o ich zaletach, technice pozyskiwania i możliwościach zastosowania. Celem tego artykułu jest przedstawienie aktualnej wiedzy o ptasich IgY.

*Słowa kluczowe:* przeciwciała, ptasie przeciwciała żółtkowe, IgY.

*Summary:* Chicken egg-yolk antibodies are great, alternative to mammalian IgG, tool in research, diagnostics and therapy. Several advantages of IgY over conventional IgG are due to distinct structural and phylogenetic difference. They are successfully used in immunoassays such as Western Blotting, ELISA, immunoprecipitation, immunohistochemistry and others. Advanced IgY technology enables to treat some bacterial and viral diseases where conventional therapy fails. Production of egg-yolk antibodies, as a minimally invasive method, brings great benefit concerning animal welfare. Egg collection and further isolation of desired antibodies is fast, simple and cost-effective. Lack of information, insufficient experience or simply reluctance to new techniques is the main reason for moderate popularity of IgY. The objective of this paper is to provide information on applications and advantages of chicken IgY.

*Keywords:* antibodies, chicken egg yolk, IgY, immunoassays.

Jedną z najważniejszych właściwości immunoglobulin jest zdolność wiązania antygeny. Immunoglobuliny od lat zajmują ważne miejsce w badaniach naukowych, diagnostyce i terapii. Stanowią wsłaniałe narzędzie pomocne w poznawaniu natury i zwalczaniu chorób.

Najczęściej używanymi przeciwciałami poli- i monoklonalnymi są ssacze immunoglobuliny IgG, które pozostawiają w cieniu nadal niedoceniane, choć znane od dawna ptasie immunoglobuliny IgY. Dotychczasowe badania IgY, oparte w większości na układzie immunologicznym kury domowej (*Gallus domesticus*), zapoczątkował w 1893 r. Klemperer [10], który jako pierwszy opisał u kur procesy przekazywania biernej odporności przeciw toksynie tężcowej. Pomimo tak długiej historii kurze IgY nie są powszechnie wykorzystywane, co może spowodowane jest brakiem informacji o metodach pozyskiwania i możliwych zastosowaniach ptasich przeciwciał. IgY mogą być lepszym narzędziem diagnostycznym, badawczym i terapeutycznym niż konwencjonalne IgG, dzięki swym unikalnym cechom. Dodatkowym czynnikiem przemawiającym na ich korzyść jest sposób otrzymywania, umożliwiający łatwe uzyskanie dużych ilości immunoglobulin, co przekłada się na niższe koszty i tak ważny szczególnie dzisiaj dobrostan zwierząt [21].

Polskojęzyczne prace naukowe dotyczące przeciwciał żółtkowych są rzadkością. Stosunkowo niedawno ukazał się interesujący artykuł przeglądowy o ich strukturze i funkcjach [22]. Nadal jednak liczne możliwe sposoby ich wykorzystywania nie są szeroko znane.

IgY jest głównym przeciwciałem u ptaków, gadów i płazów będącym odpowiednikiem ssaczych IgG. Jest przekazywane z surowicy matki do żółtka jaja decydując o biernej odporności zarodka, a później wyklutego zwierzęcia. Układ odpornościowy ptaków ma również odpowiedniki IgA i IgM, a prawdopodobne istnienie homologów IgE i IgD nie zostało do tej pory dowiedzione. Mimo podobieństw IgY znacznie różnią się budową chemiczną od IgG, albowiem całkowita masa cząsteczkowa przeciwciała kurzego jest większa, wynosi ok 167 kDa (IgG – 160 kDa), masa cząsteczkowa łańcucha ciężkiego wynosi 65 kDa (IgG – 50 kDa), lekkiego zaś – 19 kDa (IgG – 23 kDa). Łańcuch ciężki IgY ma 4 części stałe i 1 zmienną, region zawiasowy zaś jest krótszy i mniej ruchomy niż taki region IgG [6].

Cząsteczka IgY jest bardziej hydrofobowa [4,6], odporna na wahania temperatury i pH w porównaniu z immunoglobulinami G.

Duża odległość filogenetyczna pomiędzy ptakami a ssakami sprawia, że odpowiedź układu odpornościowego kury na silnie konserwatywne (*highly conserved*) antygeny ssaków jest bardzo intensywna [5]. Porównanie właściwości i cech immunoglobulin IgY oraz IgG przedstawiono w tabeli 1.

## TERAPIA I PROFILAKTYKA

Zalety IgY wynikające z ich odmiennej struktury wykorzystywane są głównie w immunochemii, w diagnostyce i badaniach naukowych, terapii i profilaktyce. Stosuje się je między innymi w testach ELISA, Western Blot, immunoprecypitacji, immunohistochemii i sortowaniu komórek. W praktyce klinicznej mogą zastępować lub wspierać terapię antybiotykową w niektórych przypadkach, np. lekooporności drobnoustrojów. Znane jest ich skuteczne działanie profilaktyczne przeciwko chorobom bakteryjnym i wirusowym. Trwają intensywne badania nad zastosowaniem IgY w ksenotransplantacji.

TABELA 1. IgY kontra IgG – porównanie

Typ przeciwciał	IgY	IgG
Zwierzę	Ptaki – kura, kaczka	Ssaki – mysz, królik, koza
Źródło izolacji	Żółtko jaja	Surowica
Ilość Ig	Duża	Ograniczona
Izolacja	Prosta, tania, nieinwazyjna	Kosztowna, stresogenna
Układ dopełniacza ssaków	Brak wiązania	Wiązanie
Czynnik reumatoidalny	Brak wiązania	Wiązanie
Receptory Fc	Brak wiązania	Wiązanie
Ig HAMA	Brak wiązania	Wiązanie
Bakteryjne białka A lub G	Brak wiązania	Wiązanie
Antygeny ssaków	Mała homologia, wysoka immunogenność	Wysoka homologia, niższa immunogenność
Aktywność i wartościowość antygenowa – awidność	Wysoka	Średnia

Różnice w budowie fragmentu Fc znacznie redukują tło w reakcjach immunochemicznych, ponieważ nie wiążą się z ssaczym czynnikiem reumatoidalnym RF (*rheumatoid factor*) czy z przeciwciałami HAMA (*human anti-mouse IgG antibodies*) [3]. Czynniki RF, odpowiedzialny za reumatoidalne zapalenie stawów pojawia się również przy innych schorzeniach, a występować może nawet u osobników zdrowych, jest autoprzeciwciałem wiążącym IgG [9]. Coraz powszechniejsze stosowanie, głównie u ludzi, mysich przeciwciał monoklonalnych zwiększa liczbę pacjentów z immunoglobulinami HAMA. W przypadku IgY niedogodności te są wykluczone [12,13].

Ptasie IgY nie aktywują również układu dopełniacza ssaków [13], nie łączą się z receptorami Fc obecnymi na komórkach układu krwionośnego, co podnosi czułość i specyficzność cytometrii przepływowej [15]. IgY nie wchodzi w reakcje z białkami bakteryjnymi: gronkowcowym A i paciorkowcowym G, proteinami, które wykazują zdolność wiązania IgG [7].

Przeciwciała ptasie mogą zastępować lub wspomagać konwencjonalne farmaceutyki w leczeniu chorób układu pokarmowego i oddechowego ludzi oraz zwierząt, co jest szczególnie ważne przy wzrastającej liczbie trudnych klinicznie przypadków czy antybiotykooporności drobnoustrojów.

Kurcze przeciwciała podawane doustnie wykazują skuteczność w schorzeniach układu oddechowego o podłożu bakteryjnym czy wirusowym, nie wykazując przy tym żadnych efektów ubocznych. Przeciwwskazaniem jest jedynie alergia pokarmowa na białko kurcze.

Immunoglobuliny, jak wszystkie białka, poddane są procesom denaturacji w przewodzie pokarmowym, ale stwierdzono, że mimo rozpadu na fragmenty Fab i Fc, części Fab nadal mają właściwości wiązania antygeny [1]. Pokrycie IgY polimerami, zamknięcie w liposomach czy zastosowanie związków neutralizujących kwaśne pH znacznie podnosi ich efektywność farmakologiczną [19].

Najlepsze efekty terapeutyczne obserwowano u noworodków, u których pH soku żołądkowego jest prawie obojętne. W grupie cieląt doświadczalnie zakażanych *Salmonella typhimurium* czy *S. dublin*, zwierzęta, którym podawano sproszkowane przeciwciała przeciwko tym patogenom, przeżywały, przy 100% śmiertelności osobników kontrolnych [23]. Podobne efekty uzyskano przy infekcjach bydłęcym koronawirusem BCV. Cielęta pozbawione specyficznej, antywirusowej ochrony w postaci IgY skierowanych przeciw BCV padały. Antywirusowe immunoglobuliny IgY zapewniały prawidłowy rozwój i przeżywalność cieląt [8].

Już kilkanaście lat temu uzyskano linie komórkowe produkujące kurze przeciwciała monoklonalne [17]. Zyskały one jednak rozgłos dopiero pod koniec lat dziewięćdziesiątych, kiedy zespół japońskich naukowców uzyskał linie komórkowe produkujące monoklonalne IgY przeciwko ssaczemu, bydłęcemu i ludzkiemu białkom. Przeciwciała te mogą być wykorzystywane w diagnostyce chorób prionowych [16].

Ksenotransplantacja jest kolejną dziedziną, w której znalazły zastosowanie kurze immunoglobuliny. Podstawą ich wykorzystania w przeszczepach tkanek między gatunkami jest brak zdolności wiązania układu dopełniacza ssaków i fragmentu Fc. Przy przeszczepach pomiędzy świnią domową a człowiekiem znacząco zmniejszają ryzyko odrzutu poprzez blokadę ksenoreaktywnych przeciwciał ludzkich [14].

Surowice przeciwko jadom węży, skorpionów i pajaków, otrzymywane najczęściej z krwi immunizowanych koni, mogą czasami powodować wystąpienie efektów ubocznych – choroby posurowiczej czy szoku anafilaktycznego. Ptasię immunoglobuliny przeciwjadowe eliminują te zagrożenia (z wyjątkiem osobników uczulonych na białko jaja kurzego), przez co mogą być racjonalną alternatywą uzasadnioną większym bezpieczeństwem stosowania i znacznie niższymi kosztami produkcji [20].

Żółtko zawiera średnio 100–400 mg IgY. Kura znosi ok. 20 jaj w miesiącu, co daje 2–3 g czystego IgY miesięcznie, w zależności od metody izolacji. Znane liczne sposoby oczyszczania i frakcjonowania pozwalają na dobór odpowiedniego postępowania w zależności od indywidualnych potrzeb, możliwości finansowych i czasowych. Obok dostępnych komercyjnych zestawów do izolacji IgY można stosować metody z użyciem glikolu polietylenowego (PEG), chloroformu, alkoholu izopropylowego, siarczanu dekstranu lub alginianu sodowego. Powszechnie stosowane są także metody chromatograficzne, frakcjonowanie żelowe czy precypitacja etanolowa [2]. W przeciwieństwie do produkcji przeciwciał u typowych zwierząt laboratoryjnych (najczęściej królik i mysz), nie ma potrzeby skrwawiania – stresogenne są jedynie zabiegi immunizacji. Antygen podawany jest najczęściej w mięsień piersiowy lub podskórnie, przy czym iniekcja domięśniowa daje znacznie silniejszą i bardziej specyficzną odpowiedź immunologiczną. Obok adjuwantu Freund'a stosuje się również inne, np. Hunters Titer Max, Specol itp. Schematy czasowe szczepień zbliżone są do stosowanych rutynowo u

zwierząt laboratoryjnych, z tym że pierwsza immunizacja zalecana jest przed wejściem ptaków w okres nieśności.

Obok typowych antygenów używanych do immunizacji coraz większą popularność zdobywają szczepionki DNA. W wielu przypadkach, kiedy otrzymanie konwencjonalnego antygeny jest bardzo trudne, kosztowne, a czasem wręcz niemożliwe, z pomocą przychodzi biologia molekularna i inżynieria genetyczna [11].

Znajomość sekwencji DNA kodującej określony fragment antygeny lub cały antygen pozwala na skonstruowanie wektora, który będzie ulegał ekspresji w hodowlach bakteryjnych lub komórkach immunizowanych zwierząt. Białka produkowane przez kultury bakteryjne stanowią już typowe antygeny mogące być użyte do immunizacji. Inną możliwość otwierają eukariotyczne wektory pozwalające na ekspresję antygeny w komórkach immunizowanych zwierząt laboratoryjnych. Przeprowadzono udane próby otrzymywania kurzych IgY za pomocą szczepionek DNA [18].

Przedstawiony powyżej szeroki wachlarz możliwych zastosowań kurzych przeciwciał w diagnostyce, terapii i badaniach naukowych, przy relatywnej prostocie i niskich kosztach otrzymywania, powinien skłaniać do ich częstszego stosowania. Odległość filogenetyczna, odmienność strukturalna i wynikające z tego właściwości to kolejne argumenty przemawiające za używaniem ptasich IgY. Nie bez znaczenia jest również fakt, że kurze przeciwciała pozyskuje się w sposób bezkrwawy, oszczędzający cierpień zwierzętom laboratoryjnym.

## PIŚMIENNICTWO

- [1] AKITA EM, LI-CHAN EC, NAKAI S. Neutralization of enterotoxigenic *Escherichia coli* heat-labile toxin by chicken egg yolk immunoglobulin Y and its antigen-binding fragments. *Food and Agricultural Immunology* 1998; **10**: 161–172.
- [2] AKITA EM, NAKAI S. Comparison of four purification methods for the production of immunoglobulins from eggs laid by hens immunized with an enterotoxigenic *E. coli* strain. *J Immunol Methods* 1993; **160**: 207–214.
- [3] BOSCATO LM, STUART MC. Incidence and specificity of interference in two-site immunoassays. *Clin Chem* 1986; **32**: 1491–1495.
- [4.] DAVALOS-PANTOJA L, ORTEGA-VINUESA JL, BASTOS-GONZALEZ D, HIDALGO-ALVAREZ R. A comparative study between the adsorption of IgY and IgG on latex particles. *J Biomater Sci Polym Ed* 2000; **11**: 657–673.
- [5] GASSMANN M, THOMMES P, WEISER T, HUBSCHER U. Efficient production of chicken egg yolk antibodies against a conserved mammalian protein. *FASEB J* 1990; **4**: 2528–2532.
- [6] HATTA H, TSUDA K, AKACHI S, KIM M, YAMAMOTO T. Productivity and some properties of egg yolk antibody (IgY) against human rotavirus compared with rabbit IgG. *Biosci Biotechnol Biochem* 1993; **57**: 450–454.
- [7] HOFFMAN WL, RUGGLES AO, TABARYA D. Chicken anti-protein A prevents *Staphylococcus aureus* protein A from binding to human and rabbit IgG in immunoassays and eliminates most false positive results. *J Immunol Methods* 1996; **198**: 67–77.
- [8] IKEMORI Y, OHTA M, UMEDA K, ICATLO FC, Jr., KUROKI M, YOKOYAMA H, KODAMA Y. Passive protection of neonatal calves against bovine coronavirus-induced diarrhea by administration of egg yolk or colostrum antibody powder. *Vet Microbiol* 1997; **58**: 105–111.
- [9] JOHNSON PM, FAULK WP. Rheumatoid factor: its nature, specificity, and production in rheumatoid arthritis. *Clin Immunol Immunopathol* 1976; **6**: 414–430.

- [10] KLEMPERER F. Ueber natürliche Immunität und ihre Verwerthung für die Immunisierungstherapie. *Archiv für Experimentelle Pathologie und Pharmakologie* 1893.
- [11] KLIMUSZKO D. Szczepionki nowej generacji. *Życie Weterynaryjne* 2002; **77**: 75–77.
- [12] LARSSON A, KARLSSON-PARRA A, SJOQUIST J. Use of chicken antibodies in enzyme immunoassays to avoid interference by rheumatoid factors. *Clin Chem* 1991; **37**: 411–414.
- [13] LARSSON A, MELLSTEDT H. Chicken antibodies: a tool to avoid interference by human anti-mouse antibodies in ELISA after *in vivo* treatment with murine monoclonal antibodies. *Hybridoma* 1992; **11**: 33–39.
- [14] LEVENTHAL JR, SU A, KAUFMAN DB, ABECASSIS MI, STUART FP, ANDERSON B, FRYER JP. Altered infectivity of porcine endogenous retrovirus by „protective” avian antibodies: implications for pig-to-human xenotransplantation. *Transplant Proc* 2001; **33**: 690.
- [15] LINDAHL TL, FESTIN R, LARSSON A. Studies of fibrinogen binding to platelets by flow cytometry: an improved method for studies of platelet activation. *Thromb Haemost* 1992; **68**: 221–225.
- [16] MATSUSHITA K, HORIUCHI H, FURUSAWA S, HORIUCHI M, SHINAGAWA M, MATSUDA H. Chicken monoclonal antibodies against synthetic bovine prion protein peptide. *J Vet Med Sci* 1998; **60**: 777–779.
- [17] NISHINAKA S, SUZUKI T, MATSUDA H, MURATA M. A new cell line for the production of chicken monoclonal antibody by hybridoma technology. *J Immunol Methods* 1991; **139**: 217–222.
- [18] ROMITO M, VILJOEN GJ, DU PLESSIS DH. Eliciting antigen-specific egg-yolk IgY with naked DNA. *Biotechniques* 2001; **31**: 670–675.
- [19] SHIMIZU M, MIWA Y, HASHIMOTO K, GOTO A. Encapsulation of chicken egg yolk immunoglobulin G (IgY) by liposomes. *Biosci Biotechnol Biochem* 1993; **57**: 1445–1449.
- [20] THALLEY BS, CARROLL SB. Rattlesnake and scorpion antivenoms from the egg yolks of immunized hens. *Biotechnology (NY)* 1990; **8**: 934–938.
- [21] TINI M, JEWELL UR, CAMENISCH G, CHILOV D, GASSMANN M. Generation and application of chicken egg-yolk antibodies. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 2002; **131**: 569–574.
- [22] TOKARZEWSKI S. Przeciwciała żółtkowe ptaków – struktura i funkcja. *Magazyn Weterynaryjny Suplement – Monografia. Choroby drobiu*. 2004: 52–54.
- [23] YOKOYAMA H, PERALTA RC, UMEDA K, HASHI T, ICATLO FC, Jr., KUROKI M, IKEMORI Y, KODAMA Y. Prevention of fatal salmonellosis in neonatal calves, using orally administered chicken egg yolk Salmonella-specific antibodies. *Am J Vet Res* 1998; **59**: 416–420.

*Redaktor prowadzący – Barbara Płytycz*

*Otrzymano: 14.07.2005 r.*

*Przyjęto: 01.10.2005 r.*

*ul. Oczapowskiego 13, 10-719, Olsztyn,  
e-mail: r.bukowski@uwm.edu.pl*