

Рекомбинантный миостатин при вакцинировании животных приводит к выработке аутоантител к эндогенному миостатину

*Всероссийский научно-исследовательский институт физиологии, биохимии и питания
животных – филиал ФГБНУ «Федеральный научный центр животноводства – ВИЖ имени
академика Л. К. Эрнста»
Боровск, Калужская обл., РФ*

Езерский В.А., Колоскова Е.М.

XIX научно-практическая межрегиональная конференция
«БИОМЕДИЦИНА И БИОМОДЕЛИРОВАНИЕ»
- 2023 -

**ФГБУН «НАУЧНЫЙ ЦЕНТР БИОМЕДИЦИНСКИХ ТЕХНОЛОГИЙ
ФЕДЕРАЛЬНОГО МЕДИКО-БИОЛОГИЧЕСКОГО АГЕНТСТВА»**

Различные **мутации естественного происхождения гена миостатина** выявлены у некоторых пород КРС, овец, британских борзых (уиппетов), у человека.

Во многих случаях в результате такие мутации связаны с **увеличением мышечной массы**.



Баран породы тексель: рост в холке до 87 см, вес до 160 кг.



Бык бельгийской голубой породы



Уиппет – английская борзая

Некоторые подходы к ингибированию активности миостатина *in vivo*:

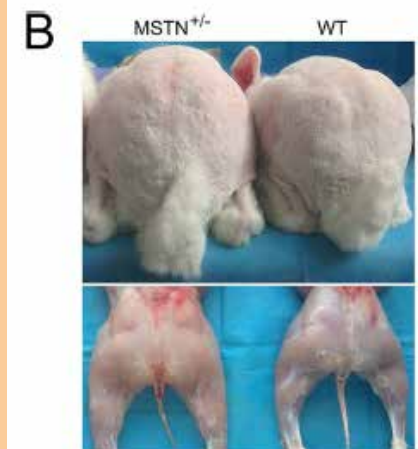
- ü **системное введение антител против миостатина;**
- ü системное введение рецептора ActRIIB;
- ü **введение антител, направленных против ActRIIB;**
- ü сверхэкспрессия или введение фоллистатина;
- ü **трансгенные модели, нокаут**

Методами генной инженерии с **нокаутом гена миостатина** были получены овцы, свиньи, собаки с фенотипом двойной мускулатурой и характеристиками повышенной мышечной массы.

С целью изучения развития мышц и улучшения качеств животных для сельского хозяйства с помощью современных генно-инженерных методов, в частности, CRISPR/Cas9 технологии, в мире уже получены **кролики MSTN KO**.



Lv, Q. et al. Efficient Generation of Myostatin Gene Mutated Rabbit by CRISPR/Cas9. Sci. Rep. 6, 25029



Технологии рекомбинантных ДНК позволяют получать и использовать в практической медицине множество белковых и пептидных препаратов, значительно повысив их доступность.

Экспрессия рекомбинантных генов в клетках *E. coli* - один из самых распространенных методов для получения рекомбинантных белков.

Рекомбинантный миостатин (pMCT), обладающий достаточной иммуногенностью в отношении **миостатина как антигена**, может быть использован для повышения мясной продуктивности сельскохозяйственных животных (крупный рогатый скот, свиньи, лошади, кролики), птицы за счет индукции синтеза специфических аутоантител к миостатину, блокирования его действия и, как следствие, стимуляции роста мышечной ткани.

Аминокислотная последовательность миостатина идентична у всех сельскохозяйственных животных. **Рекомбинантный миостатин**, как антиген, может стать универсальным средством для повышения мясной продуктивности сельскохозяйственных животных, птицы.

Предполагаемый механизм действия pMCT -
временное блокирование активности эндогенного миостатина с помощью аутоантител.

Цель:

изучение возможности нейтрализовать действие эндогенного миостатина для повышения мясной продуктивности животных с использованием иммунологического метода.

Задачи:

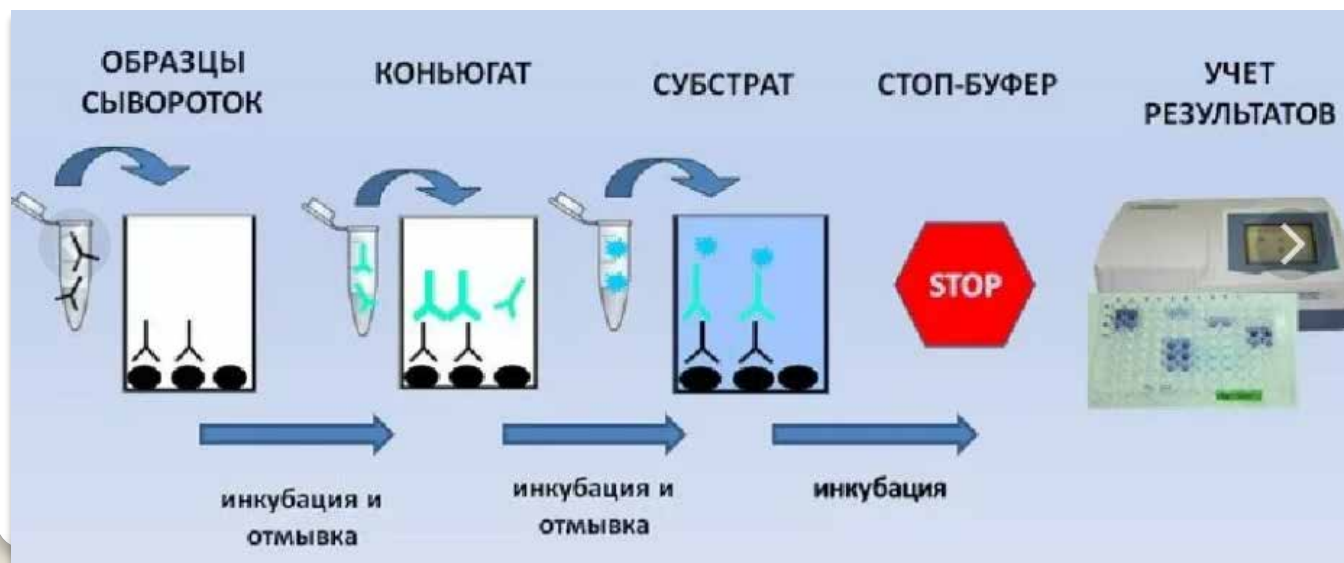
1. Иммунизировать овец полученным рекомбинантным миостатином.
2. Разработать **тест-систему** для определения титра антител к миостатину в крови.
 - Получить и очистить IgG овцы; получить аффинный сорбент с иммобилизованными овечьими антителами;
 - IgG овцы иммунизировать кроликов для получения кроличьих антител против овечьих IgG;
 - Получить аффинно очищенные антитела кролик-анти-IgG овцы и их конъюгаты с пероксидазой хрена; оценить качество конъюгата и подобрать рабочее разведение для использования в ИФА;
 - Подобрать условия проведения ИФА, оценить иммуногенность рекомбинантного миостатина у иммунизированных овец.

Для решения поставленных задач :

1. Был получен **рекомбинантный миостатин**.
2. Рекомбинантным миостатином были **иммунизированы** кролики и овцы.
3. Разработана **тест-система** для определения титра антител к миостатину в крови овец.

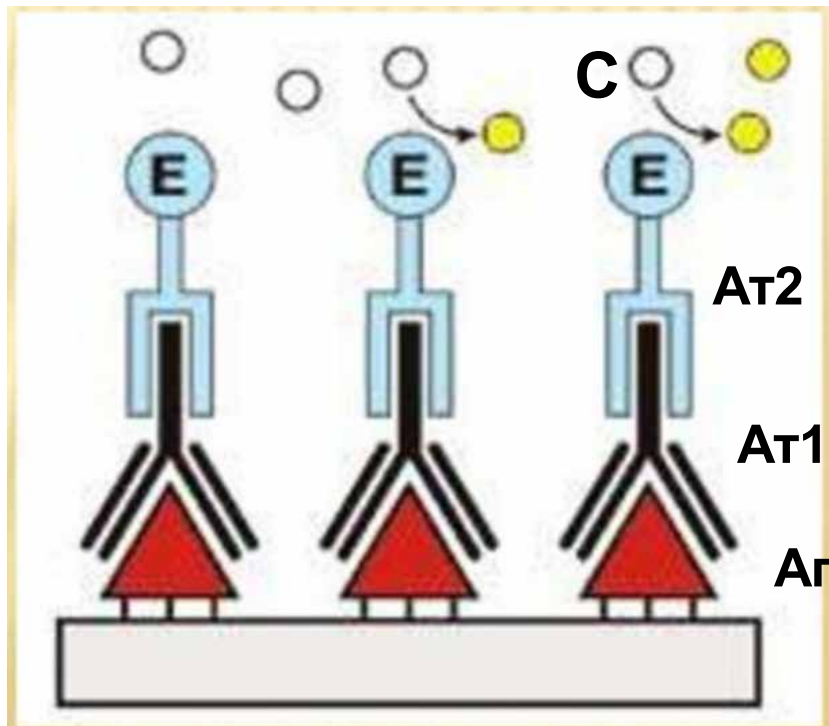
Основные этапы создания ИФА тест-системы для определения титра антител к миостатину в крови овец.

- Получены и очищены IgG овцы; получен аффинный сорбент с иммобилизованными овечьими антителами;
- Выделенными IgG овцы иммунизированы кролики для получения кроличьих антител против овечьих IgG («Кролик-анти-Овца»);
- Получены аффинно очищенные антитела «Кролик-анти-Овца»);
- Получены конъюгаты антител «Кролик-анти-Овца»с пероксидазой хрена (ПХ)
- Проведена оценка качества конъюгата «Кролик-анти-Овца/ПХ» и подобрано рабочее разведение для его использования в ИФА;
- Подобраны условия проведения ИФА, оценена иммуногенность рекомбинантного миостатина у иммунизированных овец.



Непрямой
вариант
ИФА

Схема ИФА . Непрямой метод анализа (тест-система).



Пояснения:

Аг, антиген – рекомбинантный миостатин;
Первые антитела (Ат1), специфичные к рекомбинантному миостатину – образец, сыворотка иммунизированных рекомбинантным миостатином овец;
Вторичные антитела (Ат2) - аффинно очищенные антитела кролик-анти-IgG овцы, конъюгированные с **пероксидазой хрена (Е)**. **Субстрат (С)** для пероксидазы хрена, например, 3,3',5,5'-тетраметилбензидин; субстратный буфер (содержит перекись водорода).

Справка:

Пероксидаза хрена (ПХ) широко применяется в молекулярно-биологических методиках для усиления слабого сигнала до уровня, необходимого для детекции. Белок с MW около 44 кДа, имеет четыре остатка лизина (-NH₂) для конъюгирования с молекулой (антителом), которую требуется пометить.

Продукт активности ПХ - цветное или люминесцентное соединение, подходящее для детекции и количественного анализа.

Методы анализа: для вестерн-блоттинга, разных вариантах ИФА и для иммуногистохимического анализа.

Иммуноферментный анализ.



Схема иммунизации овец.

№ овцы	Адьювант, мкл	рМСТН 5мг/мл, мкл	ФР, мкл	Способ иммунизации
1	ПАФ, 700	200	200	подкожно
2	НАФ, 700	200	200	подкожно
3	Гель $Al(OH)_3$, 550	200	350	подкожно
4	Гель $Al(OH)_3$, 550	200	350	В/мышечно, бедро.

Примечание:

ПАФ – полный адьювант
Фрейнда
НАФ - неполный
адьювант Фрейнда,
ФР – физиологический
раствор

Справка:

Полный адьювант Фрейнда - адьювант с добавлением термоинактивированных *Mycobacterium tuberculosis*. Применяется для изготовления водно-масляных эмульсий антигенов.

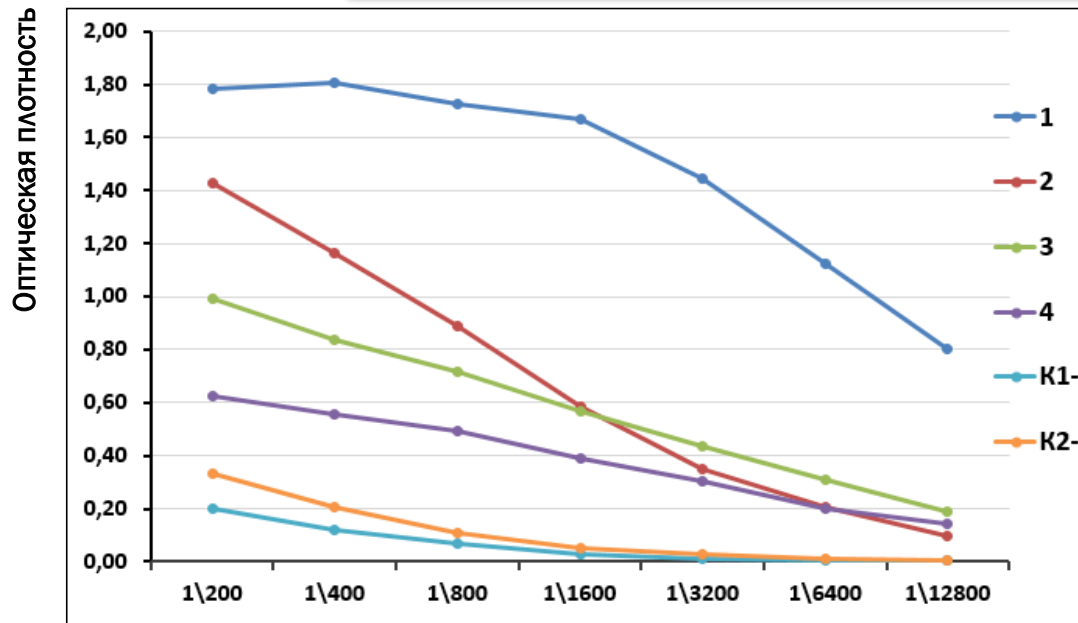
Приготовлен из неподдающихся метаболизму масел. Каждая ампула 10 мл содержит 1,5 мл маннида моноолеат, 8,5 мл парафинового масла, а также 10 мг инактивированных, высушенных *Mycobacterium tuberculosis*.

Цена ПАФ: 6 ампул по 10 мл – 27-30 тыс.руб.

Цена НАФ: 6 ампул по 10 мл – 22-24 тыс.руб

Цена геля Гидроксида алюминия (ФКП "Щелковский биокомбинат"): 800 руб/л

Титр сывороток овец, иммунизированных рМСТН, спустя 14 суток после вакцинации.



1 — иммунизация с использованием ПАФ
2 — иммунизация с НАФ
3, 4 — иммунизация с гелем гидроксида алюминия
К1, К2 — неиммунизированные овцы

разведение
сывороток

Выводы:

- 1) оптимальное разведение сывороток для ИФА — 400-800 раз. ОП сывороток иммунизированных животных в 4-15 раз выше, чем у контрольных;
- 2) титр сывороток зависит от используемого адьюванта и места введения антигена (высокий титр — при подкожной иммунизации с ПАФ, низкий — в/мышечно с гелем гидроксида алюминия);
- 3) рМСТ овец обладает иммуногенной активностью и может быть использован для иммунизации животных в составе вакцин.

Индукция синтеза специфических аутоантител к миостатину – подход к ингибированию его активности

В экспериментах на овцах было показано, что **рМСТ** обладает достаточной иммуногенностью и индуцирует синтез специфических аутоантител к миостатину.

Так как аминокислотная последовательность миостатина идентична у всех сельскохозяйственных животных, рМСТ в составе вакцин может быть использован для повышения мышечной массы.

Наработанный и очищенный рМСТ был использован при проверке его эффективности в составе вакцины в эксперименте на кроликах калифорнийской породы.

Кролики – общепринятая модель животных для биомедицинских исследований. Широко используются в качестве животной модели для изучения сердечно-сосудистых, метаболических и офтальмологических заболеваний.



Кролиководство – важная отрасль животноводства. От кроликов получают шкурки, пух, высококачественное диетическое мясо.

Изменение массы тела и среднесуточных привесов кроликов после иммунизации рекомбинантным миостатином

Схема эксперимента

Использовали кроликов калифорнийской породы: самцы в возрасте 6-7 мес. Доза рМСТ – 0,5 мг/голову

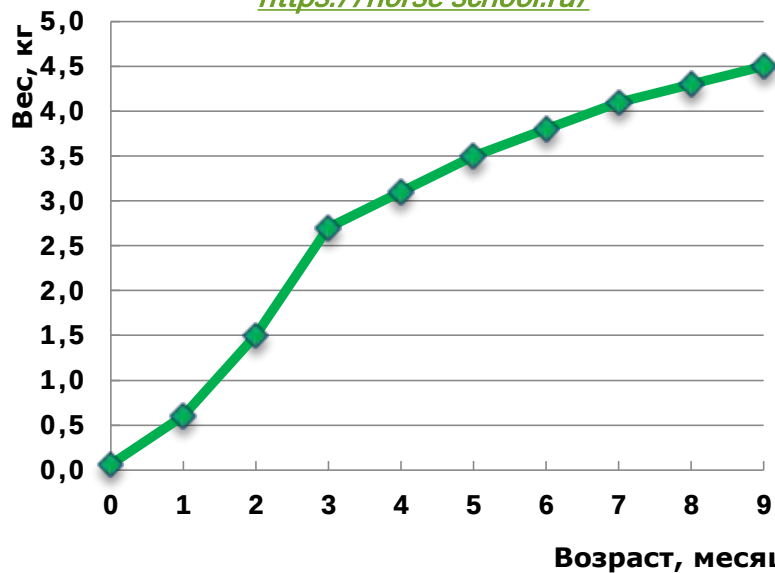
Группы кроликов	Группа 1	Группа2	Группа 3	Группа4
	Контроль	ГА п/к	ГА в/м	Масло (Монтанид) п/к
Кол-во животных	6	6	6	6
1-е сутки, Иммунизация, кг	4,04 ± 0,38	4,04 ± 0,17	4,05 ± 0,3	4,03 ± 0,13
14 суток после иммунизации, кг	4,17 ± 0,43	4,28 ± 0,22	4,24 ± 0,28	4,23 ± 0,15
среднесуточный привес за 14 суток, г	10	17	14	14
28 суток после иммунизации, кг	4,20 ± 0,52	4,43 ± 0,19	4,33 ± 0,24	4,34 ± 0,13
среднесуточный привес за 28 суток, г	6	14	10	11

Примечания:

ГА –гидроксид алюминия; Монтанид - неполный адъювант Фрейнда

Вес кролика калифорнийской породы по месяцам

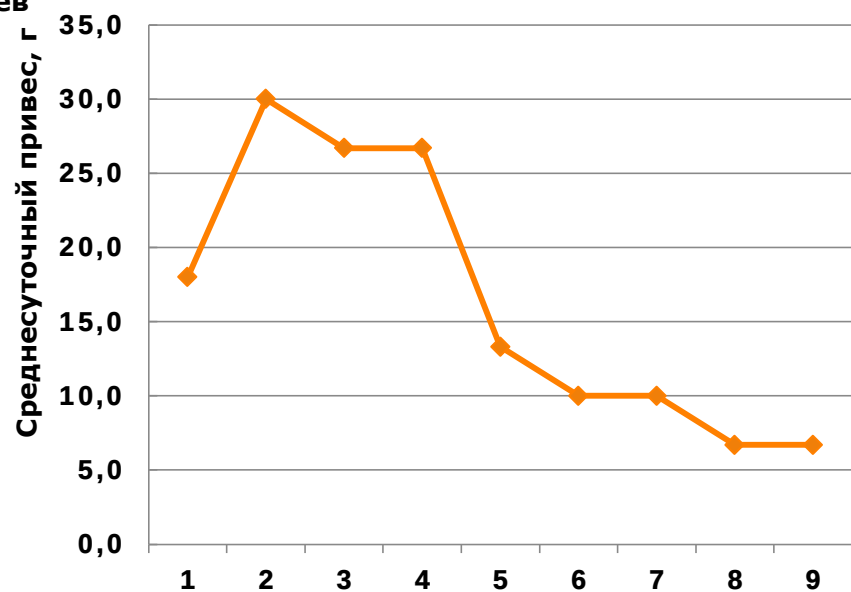
<https://horse-school.ru/>



Справка:
**Стандартные ростовые
характеристики кроликов
калифорнийской породы**



Среднесуточный привес в зависимости от возраста

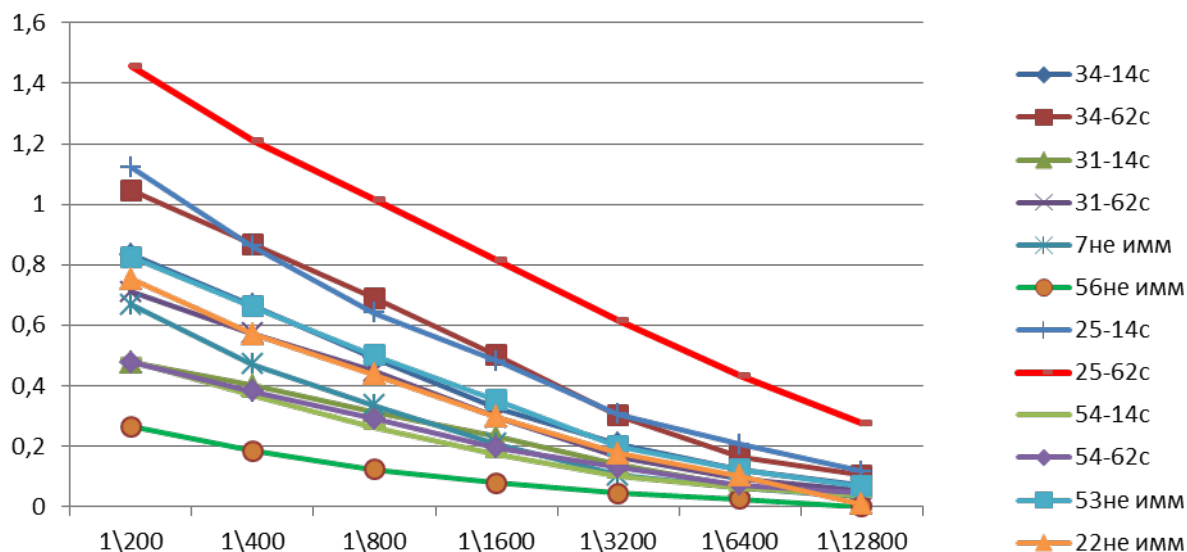


Возраст, месяцев

	34-14с	34-62с	31-14с	31-62с	7 НИ	56 НИ	25-14с	25-62с	54-14с	54-62с	53 НИ	22 НИ
1\200	0,834	1,047	0,477	0,71	0,669	0,266	1,123	1,458	0,483	0,478	0,826	0,754
1\400	0,666	0,868	0,402	0,573	0,471	0,185	0,861	1,211	0,369	0,381	0,663	0,571
1\800	0,493	0,69	0,313	0,447	0,335	0,122	0,64	1,016	0,263	0,29	0,501	0,437
1\1600	0,327	0,501	0,231	0,294	0,207	0,079	0,481	0,814	0,171	0,196	0,352	0,296
1\3200	0,207	0,302	0,139	0,165	0,104	0,044	0,306	0,615	0,102	0,129	0,199	0,175
1\6400	0,12	0,165	0,067	0,092	0,062	0,026	0,205	0,433	0,061	0,072	0,123	0,101
1\12800	0,073	0,104	0,037	0,056	0,033	0	0,117	0,275	0,038	0,046	0,068	0,008

Таблица 1. Значения ОП в зависимости от разведения сывороток, полученных от кроликов № 34, 31, 25 и 54 на 14 и 62 сутки после первой иммунизации (62 суток после первой, это 14 дней после второй иммунизации) антигеном рМСТ.

Пояснения: 1\200 ... 1\12800 – разведения сыворотки. Кролики № 7, 56, 53, 22 - не иммунизированные животные (НИ).



**Определение
иммунного ответа
кроликов
на вакцинацию
рМСТ**

При проведении ИФА в качестве вторых использовали антитела «коза-анти-кролик», меченые пероксидазой хрена

Рис. 1. Кривые титрования сывороток кроликов к антигену рМСТ. Показаны средние значения измерений оптической плотности для соответствующего разведения сыворотки.

Выводы:

- 1) При иммунизации кроликов калифорнийской породы рекомбинантным миостатином у животных всех опытных групп наблюдали прирост массы тела и среднесуточный прирост выше, чем у контрольных кроликов.
- 2) Для иммунизации рМСТ желательно использовать молодых животных, находящихся в фазе максимального роста. Например, кроликов желательно иммунизировать в возрасте 2-4 месяца.
- 3) У иммунизированных рМСТ кроликов титр антител (как и среднесуточные привесы массы), был в среднем выше, чем у неиммунизированных.
- 4) У всех кроликов исходный титр антител к миостатину в начале эксперимента значительно различался.
- 5) Титр антител увеличивался после второй иммунизации.

Спасибо за внимание!

