

Динамика роста мышц в зависимости от возраста иммунизации рекомбинантным миостатином.

*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*
О.Б. Жукова

XX научно-практическая межрегиональная конференция
«БИОМЕДИЦИНА И БИОМОДЕЛИРОВАНИЕ»
- 2024 -

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

Ген миостатина - **MSTN** (GDF-8) идентифицирован в 1997 году.
У GDF-8 KO мышей было примерно в два раза больше мышц,
чем у нормальных.

Миостатин ограничивает гипертрофированный рост мышечной массы. При дегенеративных заболеваниях, травмах и других патологиях мышечной системы, служит потенциальной мишенью для терапевтического воздействия.

Выявлена корреляция между высоким уровнем миостатина и дистрофическими изменениями скелетной мускулатуры.



Рекомбинантный миостатин (pMST), обладающий достаточной иммуногенностью в отношении миостатина как антигена, может быть использован для повышения мясной продуктивности сельскохозяйственных животных и птицы за счет индукции синтеза специфических аутоантител к эндогенному миостатину, блокирования его действия.

Аминокислотная последовательность зрелого миостатина практически идентична у всех сельскохозяйственных животных.

Аминокислотные последовательности зрелого миостатина разных видов организмов.

	1	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	1
Human	1	DFGLDCDEHSTESRCCRYPLTVDFEAFGWDWIIAPKRYKANYCSGECEFLFLQKYPHTHLVHQANPKGSAGPCC	TPTKMSPINMLYFNGKEQIIYGKIP	GMVVDR	CGCS							
Mus musculus	1	DFGLDCDEHSTESRCCRYPLTVDFEAFGWDWIIAPKRYKANYCSGECEFLFLQKYPHTHLVHQANPKGSAGPCC	TPTKMSPINMLYFNGKEQIIYGKIP	GMVVDR	CGCS							
Rattus norvegicus	1	DFGLDCDEHSTESRCCRYPLTVDFEAFGWDWIIAPKRYKANYCSGECEFLFLQKYPHTHLVHQANPKGSAGPCC	TPTKMSPINMLYFNGKEQIIYGKIP	GMVVDR	CGCS							
Gallus gallus	1	DFGLDCDEHSTESRCCRYPLTVDFEAFGWDWIIAPKRYKANYCSGECEFLFLQKYPHTHLVHQANPKGSAGPCC	TPTKMSPINMLYFNGKEQIIYGKIP	GMVVDR	CGCS							
Oryctolagus	1	DFGLDCDEHSTESRCCRYPLTVDFEAFGWDWIIAPKRYKANYCSGECEFLFLQKYPHTHLVHQANPKGSAGPCC	TPTKMSPINMLYFNGKEQIIYGKIP	GMVVDR	CGCS							
Bos taurus	1	DFGLDCDEHSTESRCCRYPLTVDFEAFGWDWIIAPKRYKANYCSGECEFLFLQKYPHTHLVHQANPKGSAGPCC	TPTKMSPINMLYFNGKEQIIYGKIP	GMVVDR	CGCS							
Sus scrofa	1	DFGLDCDEHSTESRCCRYPLTVDFEAFGWDWIIAPKRYKANYCSGECEFLFLQKYPHTHLVHQANPKGSAGPCC	TPTKMSPINMLYFNGKEQIIYGKIP	GMVVDR	CGCS							
Capra hircus	1	DFGLDCDEHSTESRCCRYPLTVDFEAFGWDWIIAPKRYKANYCSGECEFLFLQKYPHTHLVHQANPKGSAGPCC	TPTKMSPINMLYFNGKEQIIYGKIP	GMVVDR	CGCS							
Ovis aries	1	DFGLDCDEHSTESRCCRYPLTVDFEAFGWDWIIAPKRYKANYCSGECEFLFLQKYPHTHLVHQANPKGSAGPCC	TPTKMSPINMLYFNGKEQIIYGKIP	GMVVDR	CGCS							

Аминокислотная последовательность зрелого миостатина овцы – модель для рМСТ.

(выделены аминокислоты, отличающиеся от МСТ мыши)

**DFGLDCDEHSTESRCCRYPLTVDFEAFGWDWIIAPKR
YKANYCSGECEFLFLQKYPHTHLVHQANPKGSAGPCC
TPTKMSPINMLYFNGKEQIIYGKIPGMVVDRCGCS**

Последовательность pMCT (Mw 15 923 Да)

MGSSHHHHHSSGLVPRGSHMASMTGGQQMGRGSDFGLDCDEHST
ESRCCRYPLTVDFEAFGWDWIIAPKRYKANYCSGECEFLFLQKYP
HTHLVHQANPKGSAGPCCTPTKMSPINMLYFNGKEQIIYGKIPGM
VVDRCGCS*

6xHis (лиганд – Ni²⁺--сефароза, Ni²⁺-NTA агароза, элюирование 20–250 мМ имидазол, низкий pH), емкость аффинных сорбентов для металлохелатной хроматографии - до 40 мг рекомбинантного белка на 1 мл сорбента.

Ter T7 - первые 11 ак белка 10 гена фага T7: возможна очистка на иммуноаффинной колонке.

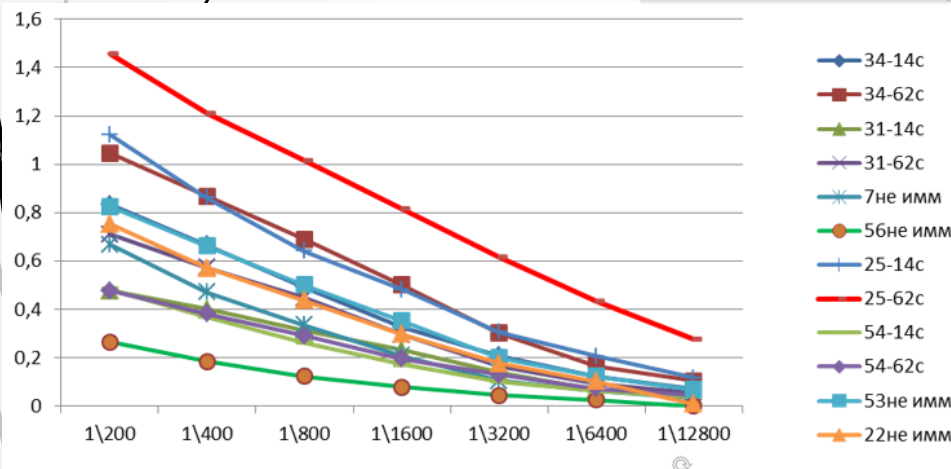
Тромбиновый сайт - узнавание протеиназой и гидролиз

Миостатин – зрелый белок

Ранее, в экспериментах на 6-7 месячных кроликах было показано, что рМСТ способен вызывать антительный ответ и обеспечивает среднесуточный привес, выше, чем у неиммунизированных кроликов

Изменение массы тела и среднесуточных привесов кроликов после иммунизации рекомбинантным миостатином

Группы кроликов	Группа 1	Группа 2	Группа 3	Группа 4
	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



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

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

Один из сделанных выводов: для иммунизации рМСТ желательно использовать *молодых животных, находящихся в фазе максимального роста*. Например, кроликов желательно иммунизировать в возрасте 2-4 месяца.

!!! Аминокислотная последовательность зрелого МСТ кролика такая же, как и у мышей.

В следующем эксперименте на модели мышей была сделана попытка определить **оптимальный возраст иммунизации животных рМСТ** с целью повышения массы тела.

Доза на одну мышь: рМСТ - 50 мкг; 200 мкл вакцины

Способ введения: подкожно, 3-5 точек.

Подготовка вакцины: 10 мкл рМСТ в 8 М мочеvine + 90 мкл физраствора + 100 мкл геля гидроксида алюминия (Щелковский биокомбинат).

Возраст мышей при иммунизации:

1 опыт – **25-28 суток**: контрольная и опытная группы по 6 самцов в каждой. Двукратная вакцинация, вторая – через 14 суток

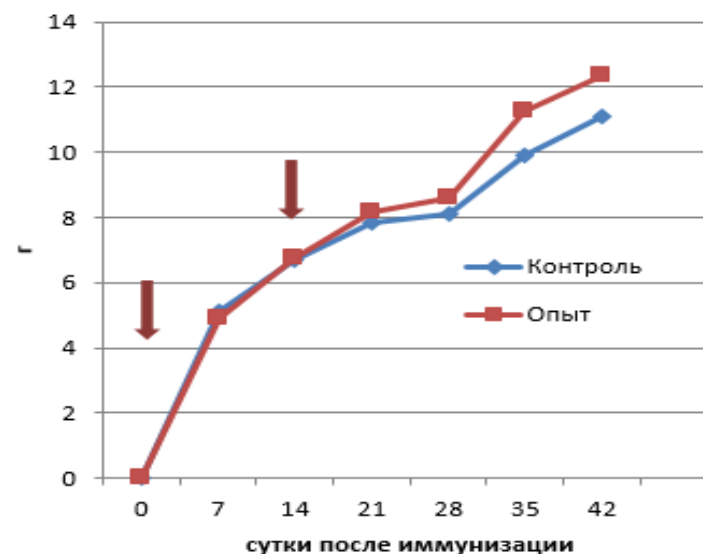
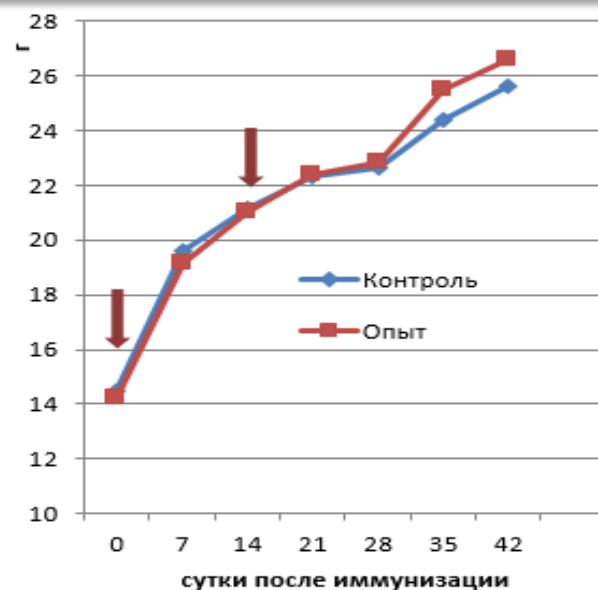
2-й опыт – **14-17 суток**: контрольная и опытная группы по 6 самцов в каждой. Однократная вакцинация.

Мышам контрольных групп вводили плацебо



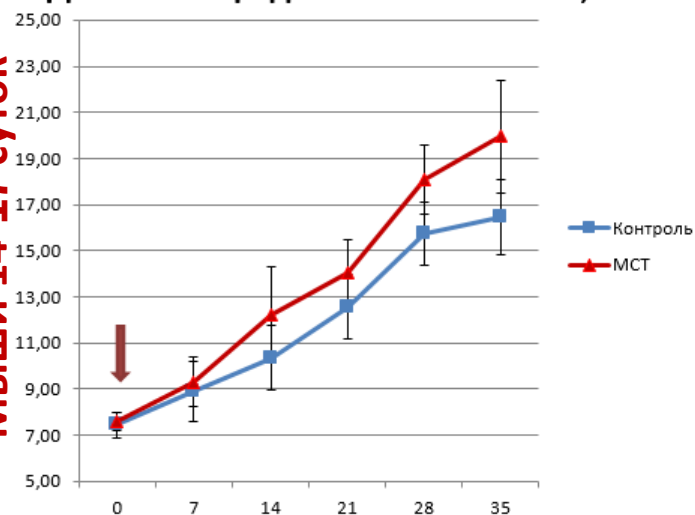
Изменение массы тела и средних привесов мышей, иммунизированных рМСТ в разном возрасте

Мыши 25-28 суток

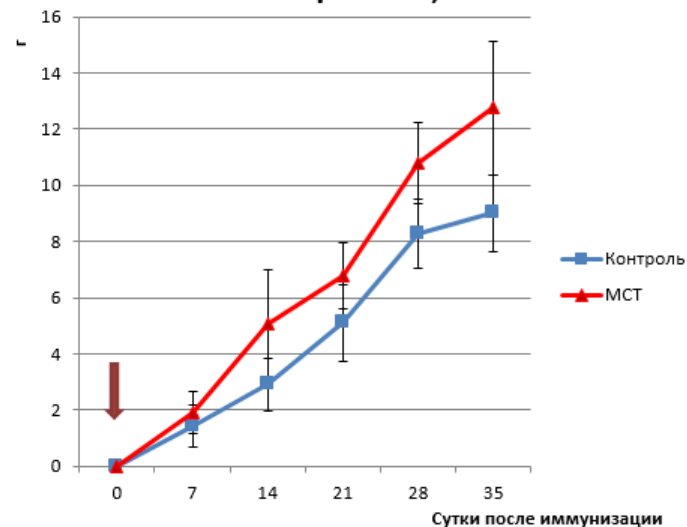


Динамика средней массы мышей, г

Мыши 14-17 суток



Привесы, г



Выводы

- вакцина, представляющая собой раствор рМСТ в гидрогеле гидроксида алюминия, эффективна при подкожной многоточечной иммунизации мышей в возрасте 14-16 суток.
- .У мышей в возрасте 25-28 суток прирост живой массы стал заметен после второй иммунизации.

**Спасибо
за внимание!**

