

ЗАВИСИМОСТЬ АНТИТЕЛЬНОГО ОТВЕТА МОЛОДНЯКА ОВЕЦ ОТ СПОСОБА ИММУНИЗАЦИИ РЕКОМБИНАНТНЫМ МИОСТАТИНОМ

В.А. Езерский, Е.М. Колоскова*

*Всероссийский научно-исследовательский институт физиологии, биохимии
и питания животных — филиал ФГБНУ «Федеральный научный центр животноводства —
ВИЖ им. академика Л.К. Эрнста»*

249013, Российская Федерация, Калужская обл., Боровск, п. Институт

Несмотря на успехи в создании генно-модифицированных животных с новыми хозяйственно-полезными признаками, иммунобиотехнологические методы представляют собой альтернативный, более традиционный и безопасный для здоровья животного способ повышения мясной продуктивности сельскохозяйственных животных. Например, животные с нокаутом гена *MSTN* имеют не только чрезмерно развитую мускулатуру, но и серьезные проблемы со здоровьем и воспроизводством. Блокировка действия эндогенного миостатина иммунными методами в фазе интенсивного роста животных может оказаться способом, востребованным для эффективного животноводства. В настоящее время для иммунизации в качестве антигенов всё чаще используют очищенные рекомбинантные белки и пептиды, обладающие низкой собственной иммуногенностью. Эффективность создаваемых вакцин зависит не только от используемого антигена, но и адъювантов, способов её введения, вида животных и определяется в основном эмпирически. Нами был получен штамм-продуцент рекомбинантного миостатина (рМСТ), белок был использован в качестве антигена в композиции с разными адъювантами для определения его иммуногенности. С гелем гидроксида алюминия в качестве адъюванта рМСТ был использован в качестве вакцины для иммунизации 4-месячных ягнят. Было показано, что однократная подкожная многоточечная иммунизация в дозировке 1 мг рМСТ/гол. приводила к осязаемому иммунному ответу и приросту живой массы.

Ключевые слова: рекомбинантный миостатин, иммунизация, ягнята, титр антител, ИФА, прирост живой массы

Конфликт интересов: авторы заявили об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование: работа выполнена в рамках государственного задания № 0445-2021-0002.

Для цитирования: Езерский В.А., Колоскова Е.М. Зависимость антительного ответа молодняка овец от способа иммунизации рекомбинантным миостатином. *Биомедицина*. 2024;20(3E):42–48. <https://doi.org/10.33647/2713-0428-20-3E-42-48>

Поступила 10.04.2024

Принята после доработки 03.06.2024

Опубликована 01.11.2024

DEPENDENCE OF THE ANTIBODY RESPONSE OF YOUNG SHEEP ON THE METHOD OF IMMUNIZATION WITH RECOMBINANT MYOSTATIN

Vadim A. Ezerskiy, Elena M. Koloskova*

*All-Russian Research Institute of Physiology, Biochemistry and Animal Nutrition —
Branch of the Federal Scientific Centre of Animal Husbandry — All-Russian Institute of Animal Husbandry
named after Academician L.K. Ernst
249013, Russian Federation, Kaluga Region, Borovsk, Institut Village*

Despite the success in creating genetically modified animals with improved economic characteristics, immunological biotechnologies represent an alternative, more conventional and safer, approach to increasing the meat productivity of farm animals. For example, animals with a knockout of the *MSTN* gene have not only overly developed muscles, but also serious health and reproduction problems. Blocking the action of endogenous myostatin by immune methods in the phase of intensive animal growth may become a high-tech and safe method for effective animal husbandry. Currently, purified recombinant proteins and peptides with a low intrinsic immunogenicity are increasingly used as antigens for immunization. The effectiveness of the created vaccines depends not only on the antigen used, but also on the methods of its administration, adjuvants, and the type of animals, being determined, as a rule, empirically. We obtained a recombinant myostatin (rMST) producing strain; the protein was used as an antigen in a composition with various adjuvants to determine its immunogenicity. The obtained rMST, along with aluminum hydroxide gel as an adjuvant, was used as a vaccine to immunize four-month-old lambs. It was shown that a single subcutaneous multipoint immunization at a dosage of 1 mg rMST per head led to a noticeable immune response and an increase in body weight.

Keywords: recombinant myostatin, immunization, vaccine, lambs, antibody titer, ELISA, live weight gain

Conflict of interest: the authors declare no conflict of interest.

Funding: the work was performed in the framework of State Project No. 0445-2021-0002.

For citation: Ezerskiy V.A., Koloskova E.M. Dependence of the Antibody Response of Young Sheep on the Method of Immunization with Recombinant Myostatin. *Journal Biomed.* 2024;20(3E):42–48. <https://doi.org/10.33647/2713-0428-20-3E-42-48>

Submitted 10.04.2024

Revised 03.06.2024

Published 01.11.2024

Введение

Мясное животноводство, в т. ч. овцеводство, — важнейшая отрасль сельского хозяйства. Повышение продуктивности и улучшение качества мяса — приоритетное направление развития отрасли. Растёт доля специализированных мясных пород, на молекулярно-генетическом уровне ведётся поиск генов и их полиморфизмов, связанных с развитием роста-весовых признаков. Белок миостатин (МСТ), продукт экспрессии гена *MSTN*, ингибирует синтез белков в мышцах, дифференцировку и пролиферацию миоцитов [6]. Определены полиморфизмы гена *MSTN*, приводящие к отсутствию белка или ограничению его функциональной активности. Острый интерес вызывает возможность геномного редактирования — нокаут гена, позволяю-

щий получать животных с эффектом «двойной мускулатуры». Однако у таких животных приобретённые качества, как правило, сопровождаются уменьшением размеров жизненно важных органов (сердца, лёгких, почек), хрупкостью костей задних конечностей, у них увеличивается восприимчивость к респираторным и прочим заболеваниям, нарушаются воспроизводительные функции (повышались эмбриональная смертность, число аборт и мёртворождений) [5].

В настоящее время активно разрабатываются способы ингибирования активности МСТ на разных уровнях [7], но для практического применения в животноводстве, ограниченном жёсткими требованиями к применению гормональных препаратов, антибиотиков, стероидов, могут оказаться предпочтительными иммунобиотехноло-

гические методы — например, системное введение антител против МСТ или возможность использования рекомбинантного МСТ (рМСТ) в качестве антигена для индукции аутоантительного ответа против эндогенного белка [10, 11]. Поскольку аминокислотная последовательность МСТ идентична у многих видов животных, рМСТ в составе вакцин может быть эффективен для повышения мясной продуктивности сельскохозяйственных животных и птицы.

С использованием оптимизированной для трансляции в бактериальных культурах нуклеотидной последовательности, кодирующей зрелый белок миостатина овцы (*Ovis aries*), нами был создан штамм-продуцент *E. coli* / *pET-MSTN*, иммуногенность рМСТ была подтверждена при вакцинации им кроликов и овец с использованием нескольких адъювантов [2, 3]. Слабая или практически отсутствующая иммуногенность хорошо очищенных рекомбинантных белков антигенов, аминокислотная последовательность которых идентична эндогенному белку, нуждается в усилении адъювантами. Иммунный ответ зависит от свойств антигена, видовых и индивидуальных особенностей организма, способов и схем иммунизации. Оптимизация иммунного ответа, как правило, достигается опытным путём [1]. Несмотря на относительно низкий, по сравнению с полным и неполным адъювантами Фрейнда, антительный ответ, для практической работы с рМСТ нами в качестве адъюванта был выбран наиболее широко применяемый гель гидроксида алюминия [2, 3]. Его адъювантная активность проявляется в способности адсорбировать антигены, формировать и медленно реализовать депо антигенов. В области введения адъюванта воспалительные реакции способствуют макрофагальному транспорту антигена к лимфатическим тканям, происходит комплекс реакций клеточного и гуморального иммунитета с продукцией иммуноглобулинов классов Е и G [1, 4, 8].

В качестве основного метода вакцинации обычно применяют внутримышечные инъекции, но адъювантные белковые вакцины, вводимые в слизистые оболочки или подкожно, индуцируют более выраженный гуморальный и клеточный иммунитет [9]: выбор способа введения вакцины может быть критичным фактором для слабых антигенов.

Целью нашего исследования была оценка влияния способа вакцинации рМСТ на антительный ответ молодняка овец.

Материалы и методы

Вакцина. Рекомбинантный МСТ в буфере с 8 М мочевиной (5 мг/мл) разводили стерильным физ. р-ром до концентрации 2 мг/мл и смешивали с адъювантом — гелем гидроксида алюминия (ГА) (Щёлковский биокомбинат, Россия), в объёмном соотношении 1:1. Доза вводимого препарата составляла 1 мг рМСТ/гол.

Опытные животные. В эксперименте использовали ягнят (баранчики) меринской породы в возрасте 4 мес. Были сформированы три группы — контрольная (К), животных в которой не иммунизировали, и две опытных группы по 8 гол. в каждой, по принципу парных аналогов. Все животные перед началом эксперимента маркировались с помощью ушных бирок с нанесённым соответствующим номером. Эксперимент проводили в зимний период. Животные содержались в производственном помещении (загон-ферма) частного овцеводческого комплекса (Московская обл.). Кормление осуществлялось по технологической схеме хозяйства, на основном рационе для овец. Вода была в свободном доступе.

Способ иммунизации. Вакцину вводили внутримышечно животным первой опытной группы (ВМ — внутримышечное введение, одноточечно в область холки), подкожно ягням второй опытной группы

(ПК, 3–4 точки в подмышечную область, лишённую плотного шёрстного покрова).

Кровь у ягнят брали из яремной вены с соблюдением правил асептики и антисептики в начале опыта, через 14 и 28 сут после вакцинации. Кровь собирали в вакуумные пробирки РУТН с активатором свёртывания (SiO_2). Сыворотку отделяли от коагулированного сгустка и хранили при -20°C до определения титра антител.

Титр сывороток измеряли с использованием собственной ИФА тест-системы [2, 3], непрямой метод. Анализируемые сыворотки (каждый образец в двух параллелях) в двукратных разведениях от 1:200 до 1:12800 вносили в лунки планшета с иммобилизованным рМСТ. В качестве вторых антител использовали антитела кролика, иммунизированного IgG овцы, меченные пероксидазой хрена (конъюгат «кролик-анти-овца-ПХ»). Пероксидазную активность конъюгата, связавшегося с овечьими антителами, аффинно захваченными иммобилизованным на планшете рМСТ, определяли хромогенной реакцией тетраметилбензидаина с перекисью водорода. Реакцию останавливали «стоп-раствором», оптическую плотность измеряли при 450 нм (OP_{450}). Результаты измерений представлены в таблице и на рисунке.

Результаты исследований

Ранее нами в экспериментах на 8-месячных кроликах и взрослых овцах было по-

казано, что рМСТ обладает достаточной иммуногенностью и индуцирует синтез антител. У иммунизированных рМСТ овец по результатам ИФА ОП450 сывороток была в 4–15 раз выше, чем у контрольных. Лучшие результаты были получены при использовании полного и неполного адъюванта Фрейнда (ПАФ и НАФ), ОП450 сывороток животных, вакцинированных с использованием геля гидроксида алюминия в качестве адъюванта, была в 1,5–2 раза ниже (при одинаковых разведениях сывороток). Однако подкожный многоточечный способ вакцинации оказался эффективнее внутримышечного: при разведении сывороток 1:400 ОП450 были 0,84 и 0,56 соответственно, что свидетельствует о лучшем иммунном ответе при подкожном способе введения вакцины [2, 3].

Применение ПАФ в экспериментах на животных ограничено рамками различных нормативных документов. Препарат используется только при первичной иммунизации животных [1]. Адъюванты на основе алюминия находят широкое применение, используются и одобрены FDA (Управление США по надзору за качеством пищевых продуктов и лекарственных средств) для применения в вакцинах.

В нашем эксперименте по результатам ИФА, выполненного с использованием собственной тест-системы, было показано, что оптическая плотность образцов сывороток ягнят контрольной и опытных групп,

Таблица. Титры антител 4-месячных ягнят контрольной и опытных групп

Table. Antibody titers of four-month-old lambs in the control and experimental groups

Группы	Сутки	Разведения сывороток, OP_{450}			
		1/200	1/400	1/800	1/1600
К	0	0,136	0,103	0,075	0,055
	14	0,106	0,069	0,046	0,042
	28	0,116	0,084	0,059	0,020
ВМ	14	0,300	0,251	0,197	0,154
	28	0,249	0,195	0,156	0,121
ПК	14	0,551	0,487	0,416	0,334
	28	0,477	0,396	0,330	0,247

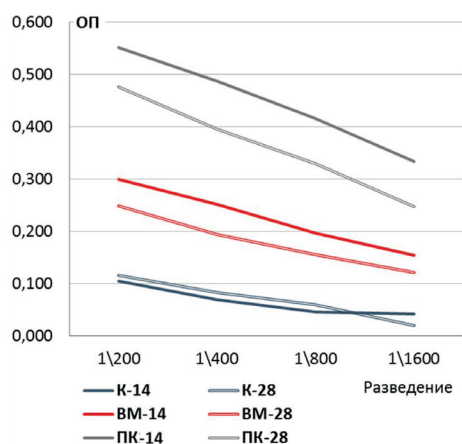


Рис. Зависимость иммунного ответа ягнят от способа иммунизации рМСТ с гелем гидроксида алюминия.
Fig. Dependence of the immune response of lambs on the method of immunization of rMST with aluminum hydroxide gel.

взятых до иммунизации животных, при разведении сывороток 1/400–1/200 находилась в интервале 0,1–0,14 о.е. В таблице и на рисунке приведены данные по титрам антител ягнят контрольной и опытных групп в течение эксперимента.

Титр антител к миостатину у ягнят контрольной группы на протяжении эксперимента оставался постоянным, тогда как у животных опытных групп, относительно высокий на 14-е сут, он снижался к концу эксперимента, оставаясь в несколько раз выше, чем у неиммунизированных ягнят. ОП450 сывороток ПК иммунизированных ягнят была в 2 раза выше, чем при внутримышечной инъекции, что свидетельствует о более высоком содержании антител в сыворотке ягнят, иммунизированных подкожно. Полученные результаты согласуются с другими нашими данными о динамике роста ягнят: живая масса ягнят с высоким титром антител (подкожное введение вакцины) через 28 сут после иммунизации была больше, чем у неиммунизированных.

Закключение

Современные технологии конструирования вакцин включают рекомбинантные, синтетические и другие препараты со слабой иммуногенностью из-за отсутствия или недостаточного содержания в них патоген-ассоциированных структур микроорганизмов, необходимых для взаимодействия с рецепторами клеток системы врождённого иммунитета, запускающих каскад сигналов для активации иммунных реакций. Многочисленные разнообразные адъюванты призваны компенсировать недостаточную иммуногенность антигенов, однако к применению в практике разрешены только соли алюминия и водно-масляная эмульсия MF-59 [4]. Считалось, что гидроксид алюминия, введённый в организм с антигеном, создаёт депо, откуда антиген медленно элиминируется. При этом возникает воспалительный очаг, привлекающий антигенпрезентирующие клетки. Установлено, что гидроксид алюминия действует на ключевые эффекторы врождённого иммунитета: дендритные клетки, NK, TLRs и продукцию цитокинов [4, 8].

Наша вакцина, представляющая собой раствор рМСТ в гидрогеле гидроксида алюминия, оказалась наиболее эффективна при подкожной многоточечной иммунизации: титр антител был выше и коррелировал с ростом ягнят. Титр антител к миостатину, относительно высокий на 14-е сут после иммунизации, уменьшался к 28-м сут: оптическая плотность образцов, определённая методом ИФА, при одинаковом разведении сывороток снижалась на 15–20%. Очевидно, повторная иммунизация животных в этот период привела бы к росту антительного ответа и возможной блокировке эндогенного миостатина, что с большой вероятностью имело бы последствием ускоренный по сравнению с неиммунизированными животными набор мышечной массы.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | REFERENCES

1. Козлов В.Г., Ожерелков С.В., Санин А.В., Кожевникова Т.Н. Адьюванты в современной медицине и ветеринарии. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2014;1:91–102. [Kozlov V.G., Ozherelkov S.V., Sanin A.V., Kozhevnikova T.N. Ad'yuvanty v sovremennoy meditsine i veterinarii [Adjuvants in modern medicine and veterinary]. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii* [Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology]. 2014;1:91–102. (In Russian)].
2. Колоскова Е.М., Езерский В.А., Жукова О.Б. Получение бактериального рекомбинантного миостатина для индуцирования синтеза специфических к миостатину аутоантител. *Биомедицина*. 2022;18(3):22–26. [Koloskova E.M., Ezerskiy V.A., Zhukova O.B. Poluchenie bakterial'nogo rekombinantnogo miostatina dlya indutsirovaniya sinteza spetsificheskikh k miostatinu autoantitel [Preparation of bacterial recombinant myostatin to induce the synthesis of myostatin-specific autoantibodies]. *Biomeditsina* [Journal Biomed]. 2022;18(3):22–26. (In Russian)]. DOI: 10.33647/2074-5982-18-3-22-26
3. Колоскова Е.М., Езерский В.А. Рекомбинантный миостатин: выделение и использование в вакцинах. *Биомедицина*. 2023;19(3):17–22. [Koloskova E.M., Ezerskiy V.A. Rekombinantnyy miostatin: vydelenie i ispol'zovanie v vaktsinakh [Recombinant myostatin: Isolation and use in vaccines]. *Biomeditsina* [Journal Biomed]. 2023;19(3):17–22. (In Russian)]. DOI: 10.33647/2074-5982-19-3-17-22
4. Курбатова Е.А., Ахматов Э.А., Ахматова Н.К., Воробьев Д.С., Егорова Н.Б., Батуро А.П., Романенко Э.Е., Цветков Ю.Е., Сухова Е.В., Яшунский Д.В., Нифантьев Н.Э. Действие гидроксид алюминия на систему врождённого иммунитета и иммуногенность бактериальных и синтетических антигенов *Streptococcus pneumoniae*. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2014;6:59–67. [Kurbatova E.A., Akhmatov E.A., Akhmatova N.K., Vorob'ev D.S., Egorova N.B., Batur A.P., Romanenko E.E., Tsvetkov Yu.E., Sukhova E.V., Yashunskiy D.V., Nifant'ev N.E. Deystvie gidroksida alyuminiya na sistemu vrozhdennogo immuniteta i immunogennost' bakterial'nykh i sinteticheskikh antigenov *Streptococcus pneumoniae* [Effect of aluminium hydroxide on innate immunity and immunogenicity of bacterial and synthetic antigens of *Streptococcus pneumoniae*]. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii* [Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology]. 2014;6:59–67. (In Russian)].
5. Трухачев В.И., Селионова М.И., Криворучко А.Ю., Айбазов А.М. Генетические маркеры мясной продуктивности овец (*Ovis aries* L.). Сообщение I. Миостатин, кальпаин, кальпаастатин. *Сельскохозяйственная биология*. 2018;53(6):1107–1119. [Trukhachev V.I., Selionova M.I., Krivoruchko A.Yu., Aibazov A.M. Geneticheskie markery myasnoy produktivnosti ovets (*Ovis aries* L.). Soobshchenie I. Miostatin, kal'pain, kal'pastatin [Genetic markers of meat productivity of sheep (*Ovis aries* L.). Report I. Myostatin, calpain, calpastatin (review)]. *Sel'sk Khozyaistvennaya biologiya* [Agricultural Biology]. 2018;53(6):1107–1119. (In Russian)]. DOI: 10.15389/agrobiology.2018.6.1107rus
6. Chen M.M., Zhao Y.P., Zhao Y., Deng S.L., Yu K. Regulation of myostatin on the growth and development of skeletal muscle. *Front. Cell Dev. Biol.* 2021;9:785712. DOI: 10.3389/fcell.2021.785712
7. Nielsen T.L., Vissing J., Krag T.O. Antimyoostatin treatment in health and disease: The story of great expectations and limited success. *Cells*. 2021;10(3):533. DOI: 10.3390/cells10030533
8. Shardlow E., Mold M., Exley C. Unraveling the enigma: Elucidating the relationship between the physicochemical properties of aluminium-based adjuvants and their immunological mechanisms of action. *Allergy Asthma Clin. Immunol.* 2018;14:80. DOI: 10.1186/s13223-018-0305-2
9. Su Y., Li D., Xing Y., Wang H., Wang J., Yuan J., Wang X., Cui F., Yin Y., Zhang X. Subcutaneous immunization with fusion protein DnaJ-ΔA146Ply without additional adjuvants induces both humoral and cellular immunity against pneumococcal infection partially depending on TLR4. *Front. Immunol.* 2017;8:686. DOI: 10.3389/fimmu.2017.00686
10. Xu Y., Mao L., Zheng Y. Prokaryotic expression and immunogenicity analysis of yak recombinant myostatin. *Anim. Biotechnol.* 2012;23(4):253–260. DOI: 10.1080/10495398.2012.722157
11. Zhang T., Yang H., Wang R., Xu K., Xin Y., Ren G., Zhou G., Zhang C., Wang L., Zhang Z. Oral administration of myostatin-specific whole recombinant yeast *Saccharomyces cerevisiae* vaccine increases body weight and muscle composition in mice. *Vaccine*. 2011;29(46):8412–8416. DOI: 10.1016/j.vaccine.2011.08.007

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ | INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Езерский Вадим Аркадьевич, Всероссийский научно-исследовательский институт физиологии, биохимии и питания животных — филиал ФГБНУ «Федеральный научный центр животноводства — ВИЖ им. академика Л.К. Эрнста»;
e-mail: ez.vadim@yandex.ru

Vadim A. Ezerskiy, All-Russian Research Institute of Physiology, Biochemistry and Animal Nutrition — Branch of the Federal Scientific Centre of Animal Husbandry — All-Russian Institute of Animal Husbandry named after Academician L.K. Ernst;
e-mail: ez.vadim@yandex.ru

Колоскова Елена Михайловна*, к.б.н., Всероссийский научно-исследовательский институт физиологии, биохимии и питания животных — филиал ФГБНУ «Федеральный научный центр животноводства — ВИЖ им. академика Л.К. Эрнста»;
e-mail: heleko3@yandex.ru

Elena M. Koloskova*, Cand. Sci. (Biol.), All-Russian Research Institute of Physiology, Biochemistry and Animal Nutrition — Branch of the Federal Scientific Centre of Animal Husbandry — All-Russian Institute of Animal Husbandry named after Academician L.K. Ernst;
e-mail: heleko3@yandex.ru

* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author