

## СРАВНИТЕЛЬНОЕ ДЕЙСТВИЕ РЕКОМБИНАНТНОГО КОЛИЦИНА E2 НА НЕКОТОРЫЕ ФАКТОРЫ КЛЕТОЧНОГО ИММУНИТЕТА ПРИ АДЕНОВИРОЗЕ ТЕЛЯТ

М.А. Азямов, канд. вет. наук, ведущий научный сотрудник  
Федеральный аграрный научный центр Северо-Востока имени Н.В. Рудницкого  
(Россия, г. Киров)

DOI:10.24412/2500-1000-2023-10-4-70-74

**Аннотация.** Исследовано сравнительное действие рекомбинантного колицина E2 (RecColE2) на некоторые показатели клеточного иммунитета при аденовиروзе телят. Установлено, что RecColE2 и интерферон бычий рекомбинантный (RecIFb) через 10 дней терапии купировали симптомы заболевания. При применении RecColE2 на десятые сутки в крови телят констатировали снижение до физиологического уровня показатели количества интерлейкинов IL-1 $\alpha$ , IL-4, дефензина DEF $\beta$ 2 и маркера мембранных белков CD282.

**Ключевые слова:** аденовирус 2 типа, дефензины, интерлейкины, интерферон, колицин E2, телята, фагоцитарная активность.

Аденовирусные инфекции диагностируются в популяциях крупного рогатого скота во всем мире [1, 2]. Аденовирусы обладают высокой устойчивостью к химическим детергенам и физическим воздействиям, а также при репликации в организме животных и людей могут образовывать внутриядерные включения из вирусных вирионов в виде агрегатов кристаллоподобного строения [3, 4].

Аденовирусы строго специфичны, но геном аденовируса 2 типа у крупного рогатого скота на 92% сходен с геномом аденовируса 2 типа человека. При исследовании альтернативного сплайсинга аденовируса 2 типа установлено продуцирование более девятисот типов М-РНК (мессенджерных рибонуклеиновых кислот), кодирующих синтез вирусных белковых компонентов, подавляющих гуморальный и клеточный иммунитет организма животных [5, 6].

В связи с актуальностью изучения действия биологически активных препаратов для лечения телят при аденовирусной инфекции целью нашего исследования являлось изучение сравнительного действия рекомбинантного колицина E2 (патент №2188233 от 2708.2002, ТУ 9337-010-00008064-01) [7, 8] и рекомбинантного интерферона бычьего (БелАгроГен, Беларусь) на некоторые факторы клеточного

иммунитета организма телят больных аденовирозом.

### Материалы и методы

Сравнительное действие рекомбинантного колицина E2 (RecColE2) на некоторые факторы клеточного иммунитета изучали на телятах 3-4-недельного возраста. Были сформированы 3 группы по 10 телят в каждой. Первую (контрольную) группу составляли здоровые телята. Вторую и третью (подопытные) формировали из больных аденовирозом телят. У телят диагностировали ларингофарингиты и бронхиты, симптомов поражения желудочно-кишечного тракта не наблюдали.

Телят второй и третьей групп лечили с применением симптоматических средств и антибиотика цефтоина (для подавления секундарной микрофлоры) по соответствующим инструкциям. Телятам второй группы вводили рекомбинантный бычий интерферон (БелАгроГен, Беларусь) в дозе 1,0 см<sup>3</sup> на 10 кг массы один раз в сутки в течение семи суток по инструкции. Рекомбинантный бычий интерферон (RecIFb) содержал 10 тыс. единиц интерферона в 1,0 см<sup>3</sup>. Телятам третьей (подопытной) группы вводили RecColE2 в дозе 5 мл (500 мкг) внутримышечно один раз в сутки в течение семи суток. На 1-е и на 10-е сутки у животных всех групп исследовали

кровь на показатели клеточного иммунитета.

Количество лейкоцитов в крови телят, фагоцитарный показатель и фагоцитарный индекс определяли в соответствии с методическими рекомендациями по оценке и коррекции иммунного статуса животных [9].

Уровень цитокинов интерлейкина-1  $\alpha$  (IL-1 $\alpha$ ), интерлейкина-4 (IL-4) и количество маркерного рецептора CD282 определяли методом иммуноферментного анализа (ИФА) диагностикумами Clon Cloud Co (США) и Cusabio Biotech Co (Китай) на иммуноферментном анализаторе Zenyth 340 («Anthos», Китай).

Количество в крови дефензинов  $\beta$ 1 (DEF $\beta$ 1) и дефензинов  $\beta$ 2 (DEF $\beta$ 2) определяли методом ИФА диагностикумами Clon Cloud Co (США) и Agilent Technologies (США).

Статистическую обработку данных проводили по программе Statistica [10].

#### **Результаты и обсуждения**

На первые сутки исследования у телят второй и третьей подопытных групп отмечали снижение аппетита, депрессию, слизистые истечения из носовой полости, сухой кашель и повышение температуры до 41-41,5 $^{\circ}$ C. Из смывов носовой полости и бронхиального лаважа на культурах клеток ЛЭК (легкие эмбриона коровы) и MDBK (Madin Darby Bull Kidney) с последующей идентификацией в РИФ (реакции иммунофлюоресценции) и ИФА был выделен и типирован аденовирус крупного рогатого скота 2 типа (Adv2).

В крови больных телят второй и третьей групп не наблюдали увеличения количества лейкоцитов, но констатировали повышение фагоцитарного показателя и фагоцитарного индекса, что указывало на усиление фагоцитарной активности популяции лейкоцитов без количественного ее увеличения (таблица). Отмечали резкое

повышение провоспалительного цитокина IL-1 $\alpha$ , вырабатываемого лейкоцитами и эпителием бронхов и вызывающего воспаление и лихорадку. Количество IL-1 $\alpha$  в крови телят третьей (подопытной) группы, по сравнению показателями первой (контрольной) группы, повысилось с 39,82 $\pm$ 0,86 до 420,91 $\pm$ 1,22 пг/мл ( $P < 0,05$ ). Повышение уровня провоспалительных цитокинов в крови больных телят второй и третьей групп вызвало ускоренное высвобождение больших количеств ключевого ингибитора воспаления IL-4, который усиливал иммунный ответ и подавлял экспрессию IL-1 $\alpha$  (таблица). Повреждение эпителия бронхов и у больных телят вызвало каскад цитокиновых реакций, с увеличением в 13 раз по сравнению с показателями крови в контрольной группе, CD282-маркера мембранного белка Toll-подобного рецептора 2 (TLR-2), обеспечивающего функционирование врожденного иммунитета от вирусных антигенов. Увеличение в крови маркерного белка CD282 с 1,26 $\pm$ 0,14 (первая группа контрольная) до 17,12 $\pm$ 0,18 нг/мл (третья группа подопытная) показало, что процесс взаимодействия аденовирусного паттерна идет через TLR-2 паттерн распознающий рецептор. Не наблюдалось значительного повышения в крови телят второй и третьей групп катионного пептида DEF $\beta$ 1-фактора врожденной резистентности организма. DEF $\beta$ 1 блокировал вирусные рецепторы и взаимодействовал с клетками бронхиального эпителия, но отсутствие его количественного увеличения не повлияло на развитие вирусного процесса. В крови животных второй и третьей групп отмечали повышение DEF $\beta$ 2 с 16,8 $\pm$ 0,92 до 387,56 $\pm$ 0,28 ( $P < 0,05$ ), что указывало на активацию воспалительного процесса в организме направленного на ингибирование вируса [11, 12].

Таблица. Действие рекомбинантного колицина E2 на некоторые факторы иммунитета телят при аденовирозе

№ п/п	Показатели	1-е сутки			10-е сутки		
		Первая группа контрольная n=10 здоровые	Вторая группа контрольная n=10 RecIFb	Третья группа подопытная n=10 RecColE2	Первая группа контрольная n=10 здоровые	Вторая группа контрольная n=10 RecIFb	Третья группа подопытная n=10 RecColE2
1.	Лейкоциты, 10 <sup>9</sup> /л	8,45±0,06	8,62±0,08	7,96±0,05	8,38±0,09	7,32±0,34	8,12±0,92
2.	Фагоцитарный показатель, %	34,2±0,4	58,8±0,6*	57,3±0,8*	32,8±0,5	52,9±0,4	36,8±0,7
3.	Фагоцитарный индекс	4,3±0,12	6,9±0,42	6,4±0,58	4,6±0,14	6,2±0,88	4,8±0,24
4.	IL-1α, пг/мл	39,82±0,86	420,91±1,22*	431,15±1,16*	41,40±0,75	361,42±0,98**	42,52±0,76***
5.	IL-4, пг/мл	18,56±0,94	156,24±0,82*	168,13±0,95*	17,48±0,86	161,15±1,24	18,14±0,98
6.	CD282, нг/мл	1,26±0,14	16,55±0,24*	17,12±0,18*	1,14±0,21	15,58±0,62**	1,18±0,15***
7.	DEFβ1, пг/мл	1,34±0,11	1,58±0,22	1,46±0,21	1,38±0,18	1,62±0,48	1,86±0,29
8.	DEFβ2, пг/мл	16,8±0,92	460,71±1,15*	387,56±0,28*	15,9±0,47	380,49±0,83**	18,25±0,99***

\*  $P < 0,05$  – 2-я и 3-я группы по отношению к контролю на 1-е сутки;

\*\*  $P < 0,05$  – 2-я группа по отношению к контролю на 10-е сутки;

\*\*\*  $P < 0,05$  – 3-я группа по отношению ко 2-й группе на 10-е сутки.

На восьмые сутки у телят второй и третьей подопытных групп отмечали нормализацию температуры, отсутствие симптомов аденовироза и отрицательные результаты в РИФ и ИФА у всех животных третьей группы. У 40% телят второй группы констатировали выделение из бронхального лаважа и идентификацию Adv2.

На десятые сутки у животных всех трёх групп брали кровь на исследование некоторых факторов клеточного иммунитета. Терапия с использованием RecIFb снижала количество лейкоцитов в крови телят второй группы с  $8,62 \pm 0,08$  до  $7,32 \pm 0,34 \cdot 10^9/\text{л}$  без заметного снижения фагоцитарного показателя и фагоцитарного индекса (таблица). Провоспалительный цитокин IL-1α снижался незначительно с  $420,91 \pm 1,22$  до  $361,42 \pm 0,98$  пг/мл, количество IL-4 в крови практически осталось на прежнем уровне первых суток исследования.

После курса лечения RecIFb количество DEFβ1 в крови не изменилось, а уровень DEFβ2 оставался высоким (таблица). Повышенное количество IL-1α, IL-4 и DEFβ2 в крови телят второй группы указывало на неполную компенсацию клеточного иммунитета после заболевания и на возможность рецидивов аденовирусной инфекции.

В крови телят третьей (подопытной) группы после курса терапии с применением Rec ColE2 отмечали нормализацию значений фагоцитарного показателя и фагоцитарного индекса в связи с подавлением инфекционного процесса в эпителии трахеи и бронхов и снижении пролиферации лейкоцитов (таблица) [13, 14]. Принимая во внимание Toll-зависимую рецепторную транслокацию колицинов и активацию TLR-2 системы под воздействием Rec ColE2 для распознавания генома Adv2, отмечали снижение CD282 с  $17,12 \pm 0,18$  до  $1,86 \pm 0,29$  нг/мл в связи с подавлением репликации вируса [15]. Кроме того RecColE2 в процессе лечения активировал DEFβ2, который ингибировал раскрытие вируса и проникновение эндосомального белка Adv2 в клетки эпителия бронхов путем связывания капсида в области пептонов [16]. При прекращении воспалительного процесса и полной элиминации вируса показатели DEFβ2, IL-1α, IL-4 в крови телят третьей группы снизились до физиологической нормы.

#### Заключение

В результате выполненных исследований установлено, что воспалительная реакция на эпителиальные клетки бронхов больных аденовирозом телят идет по TLR2

типу, при этом повышались фагоцитарная активность лейкоцитов, показатели цитокинов IL-1 $\alpha$ , IL-4 и уровень DEF $\beta$ 2 в крови больных телят. Было продемонстрировано выраженное иммунопротективное дей-

ствие RecColE2 на клеточный иммунитет организма телят. Полученные результаты подтверждают активацию DEF $\beta$ 2 и его влияние на подавление репликации Adv2.

#### Библиографический список

1. Гаффаров Х.З. Ретроспективный анализ респираторно-кишечных вирусов, циркулирующих среди поголовья крупного рогатого скота в регионе Среднего Поволжья // Ученые записки Казанской государственной академии ветеринарной медицины им. Н.Э. Баумана. – 2013. – Т. 216. – С. 78–84.
2. Lehmkuhl H.D., Habbs L.A. Serologic and hexon phylogenetic analysis of ruminant adenoviruses // Arch. Virol. – 2008. – № 153. – P. 891-897.
3. Chapron C.D. Detection of astroviruses, enteroviruses and adenoviruses types 40 and 41 in surface waters collected and evaluated by the information collection rule and integrated cell culture-nested PCR procedure // Applied and Environmental Microbiology. – 2000. – № 66. – P. 2520-2525.
4. Romanowski E.G., Gordon Y.J., Araullo-Cruz T. The antiviral resistance and replication of cidofovir-resistant adenovirus variants in the New Zealand white rabbit ocular model // Invest Ophthalmol Vis Sci. – 2001. – V. 42. № 8. – P. 1812-1815.
5. Li R, Gao S, Chen H, Zhang X, Yang X, Zhao J, Wang Z. Virus usurps alternative splicing to clear the decks for infection. Virol J. 2023 Jun 20, №20 (1):131. doi: 10.1186/s12985-023-02098-9.
6. Chow LT, Broker TR, Lewis JB. 1979. Complex splicing patterns of RNAs from the early regions of adenovirus-2. J Mol Biol 134:265–303. doi:10.1016/0022-2836(79)90036-6.
7. Азямов М.А., Тихонов И.В., Девришов Д.А. Получение гибридного колицина E2 // Ветеринарная медицина. – 2002. – №1. – С. 13. – [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://www.veterinarymedicine.ru/num1-2002.html>.
8. Азямов М.А. Штамм бактерий *B.subtilis* pbColE2 – продуцент гибридного колицина E2, используемый для получения ветеринарного препарата. Патент №2188233 от 27.08.2002.
9. Методические рекомендации по оценке и коррекции иммунного статуса животных // Под ред. Шахова А.Г. – Воронеж, 2005. – 115 с.
10. Реброва О.Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA. – М.: МедиаСфера. 2002. – 312 с.
11. Luenser K., Ludwig A. Variability and evolution of bovine beta-defensin genes // Genes Immun. – 2005. – №6 (2). – P. 115-22. DOI: 10.1038/sj.gene.6364153.
12. Islam S., Akhand M., Hasan M. Evolutionary trend of bovine  $\beta$ -defensin proteins toward functionality prediction: A domain-based bioinformatics study // Heliyon. – 2023. – № 9 (3). – P. e14158. DOI: 10.1016/j.heliyon.2023.e14158.
13. Азямов М.А., Воронин Е.С., Тихонов И.В., Девришов Д.А., Маслов С.А., Зверьков Д.А. Изучение биологических свойств гибридного колицина E2, полученного с использованием питательных сред из непищевого сырья // Тезисы докл. Всероссийской науч.-практич. конф., посвящ. 30-летию ВНИТИБП. – Щелково, М.: РСХА, 2001. – С. 356-357.
14. Sharma O., Zakharov S.D., Zhalnina M.V., Yamashita E., Cramer W.A. Handbook of Biologically Active Peptides // Academic Press. – 2013. – P. 93-100. DOI: ORG/10.1016/B978-0-12-385095-9.00017-8.
15. Gratia J.P. Colicins in the Encyclopedia of Genetics // Academic Press. – 2001. – P. 417-418. DOI: Org/10.1006/Rwgn.2001.0245.
16. Smith J.G., Silvestry M., Lindert S., Lu W., Nemerow G.R., Stewart Ph.L. Insight into the mechanisms of adenovirus capsid disassembly from studies of defensin neutralization // PLoS Pathog. – 2010. – № 6 (6). – P. e1000959. DOI: 10.1371/journal.ppat.1000959.

## THE RECOMBINANT COLICIN E2 COMPARATIVE EFFECT ON SOME CELLULAR IMMUNITY FACTORS IN CALF ADENOVIROSI

**M.A. Aziamov**, *Candidate of Veterinary Sciences, Leading Researcher*  
**Federal Agricultural Research Center of North-East named N.V. Rudnitskiy**  
**(Russia, Kirov)**

**Abstract.** *The recombinant colicin E2 (RecColE2) comparative effect on some cellular immunity factors in calf adenovirosis was studied. The RecColE2 and bovine recombinant interferon (RecIFb) stopped the symptoms of the disease after 10 days of therapy was found. When using RecColE2 on the tenth day in the blood of calves, the indicators of the number of interleukins IL-1 $\alpha$ , IL-4, defensin DEF $\beta$ 2 and the marker of membrane proteins CD282 were found to decrease to a physiological level.*

**Keywords:** *adenovirus type 2 of cattle, defensins, interleukins, interferon, calves, colicin E2, phagocytic activity.*