

ВЛИЯНИЕ РЕКОМБИНАНТНОГО КОЛИЦИНА E2 НА НЕКОТОРЫЕ ГЕРИАТРИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ БЕЛЫХ МЫШЕЙ В ВОЗРАСТЕ 1,5-2 ЛЕТ

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

DOI:10.24412/2500-1000-2023-11-3-236-239

Аннотация. Исследовано влияние рекомбинантного колицина E2 (RecColE2) на некоторые гериатрические показатели белых мышей-самцов в возрасте 1,5-2 лет. Препарат вводили мышам подопытной группы в течение 365 дней подкожно в дозе 25 мкг (0,25 см³) в первый месяц один раз в неделю, в последующие 11 месяцев два раза в месяц.

Установлено, что через 365 суток после применения RecColE2 в подопытной группе отмечали сохранение длины теломер лимфоцитов CD4⁺, увеличение показателей противовоспалительных цитокинов, снижение простагландина E2 в крови и количества аберраций в клетках костного мозга.

Ключевые слова: аберрации, белые мыши, гериатрические свойства, колицин E2, теломеры, цитокины.

Продуктивное долголетие молочных коров остается важной проблемой в животноводстве. Животные могут сохранять высокую продуктивность в течение 8-9 лактаций, но в реальности этот период снижен в два раза [1]. С началом лактации высокопродуктивные дойные коровы подвергаются метаболическому стрессу, связанному с ним изменению длины теломер, цитокинового статуса и других маркеров старения [2]. С возрастом эти процессы усиливаются.

В связи с этим, исследование действия препаратов способных влиять на физиологические функции и гериатрические показатели пожилых животных представляет определенный интерес [3].

Целью работы явилось изучение действия рекомбинантного колицина E2 (RecColE2) на некоторые гериатрические показатели пожилых белых беспородных мышей.

Материалы и методы

Исследование проводили на белых беспородных мышах-самцах в возрасте от 1,5 до 2-х лет весом 25-27 г. Были сформированы две группы мышей по 10 голов в группе. Животных содержали при естественном режиме освещения и свободном доступе к воде и пище. Эксперименты выполняли в соответствии с международными рекомендациями Европейской конвен-

ции о защите позвоночных животных для исследований от 18 марта 1986 года.

Мышей контрольной (интактной) группы не подвергали манипуляциям. Мышам подопытной группы вводили RecColE2 в дозе 0,25 мл (25 мкг) подкожно первый месяц один раз в неделю и последующие 11 месяцев два раза в месяц [4, 5].

У животных проводили исследование крови на 1-е и 365-е сутки эксперимента. Длину теломер Т-хелперов CD4⁺ периферической крови в качестве маркера процесса старения и физиологического состояния организма определяли методом Flowfish гибридизации in situ с анализом на проточном цитофлуориметре Facs Calibur (Becton Dickinson) [6]. Количество цитокинов интерлейкина-4 (ИЛ-4) и интерлейкина-12 (ИЛ-12), фактора некроза опухолей альфа (TNF- α) и простагландина E2 (PG E2) определяли методом иммуноферментного анализа (ИФА) диагностикумами Clon Cloud Co (США) и Cusabio Biotech Co (Китай) на ИФА-анализаторе Zenyth (Athos).

В последний день опыта мышей усыпляли декапитацией. За час до забоя мышам вводили колхицин в дозе 4,5 мкг/г массы тела внутривентриально. Суспензию клеток костного мозга, полученную из бедренных костей, русуспендировали в растворе Хенкса, центрифугировали при 1000 об./мин.

10 мин., удаляли надосадочную жидкость, осадок ресуспендировали в 0,075M растворе хлорида калия в течение 25 минут при 37⁰C, затем центрифугировали и удаляли супернатант. К осадку добавляли холодную (-30⁰C) смесь этанола и ледяной уксусной кислоты в соотношении 3:1. Суспензию помещали на 30 мин. в холодильник при -40⁰C, затем ресуспендировали, центрифугировали и удаляли супернатант. Клетки ресуспендировали и отмывали фиксатором. Затем удаляли супернатант и 0,5 мл клеточной взвеси фиксировали в смеси этанола и ледяной кислоты в течение 20 мин., после чего наносили каплями на охлажденные предметные стекла. После окраски азури-эозином, метафазы анализировали на появление хромосомных аберраций. Анализировали по 100 метафаз от каждого животного.

Учитывали число одиночных и парных фрагментов, изменения структуры (делеции, инверсии, транслокации), ахроматических пробелов (гепов), число клеток с множественными повреждениями хромосом.

Статистическая обработка данных выполнена стандартными методами в программе «Statistica-5,0» [7].

Результаты и обсуждения

При исследовании длины теломер в лимфоцитах CD4⁺ в периферической крови

мышей в возрасте 1,5-2-х лет по окончании опыта установлено укорочение длины теломер в контрольной (интактной) группе с 18,25±0,14 до 10,68±0,62 тыс.п.н. (тысяч пар нуклеотидов). В подопытной группе не отмечали снижение длины теломер. Теломеры позвоночных представляют собой специализированные концевые структуры хромосом, состоящие из tandemных повторов TTAGGG и функционирующих для защиты хромосом от слияния, рекомбинации и деградации. Укорочение теломер инициировало процесс апоптоза клеток и было связано с сокращением продолжительности жизни и состоянием здоровья организма [8]. Снижение длины теломер лимфоцитов CD4⁺ у животных контрольной группы отражало уровень возрастной иммуносупрессии, уменьшение пролиферативной и фагоцитарной активности популяции Т-хелперов в периферической крови. В контрольной группе пожилых мышей отмечали некоторое повышение в крови количества PG E2 – основного медиатора воспалительного ответа, влияющего на усиление отёка, лейкоцитарной инфильтрации, бронхострикции, тромбообразования и ингибирования глицинергической нейротрансмиссии спинного мозга [9]. В группе подопытных животных количество PG E2 достоверно снижалось (таблица).

Таблица. Влияние RecColE2 на некоторые гериатрические показатели белых мышей в возрасте 1,5-2-х лет.

Показатели	1-е сутки исследования		365-е сутки исследования	
	1 группа интактная (контрольная) n=10	2 группа (подопытная) n=10	1 группа интактная (контрольная) n=10	2 группа после применения RecColE2 (подопытная) n=10
Длина теломер в лимфоцитах CD4 ⁺ , тыс.п.н.	18,25±0,14	17,84±0,16	10,68±0,62*	17,96±0,38
PG E2, пг/мл	1850,4±5,28	2114,2±6,15	2148,7±8,24	654,9±2,82*
IL-4, пг/мл	72,8±1,44	68,7±0,86	62,5±1,64*	112,8±1,25*
IL-12, пг/мл	115,2±2,89	81,6±1,34	104,2±0,96*	216,8±1,36*
TNF-α, пг/мл	104,2±1,26	96,8±2,14	85,7±3,18*	115,92±2,84*
Число клеток костного мозга с повреждением хромосом, %			3,1±0,05	0,65±0,07**

* $P < 0,05$ – по отношению к 1-м суткам исследования;

** $P < 0,05$ – по отношению к контрольной группе на 365-е сутки.

В крови мышей подопытной группы констатировали повышение IL-4 – ключе-

вого ингибитора противовоспалительных цитокинов и активатора гуморального им-

мунитета. Также отмечали повышение IL-12 и TNF- α – цитокинов, стимулирующих естественные киллеры и активаторы цитотоксических Т-лимфоцитов, вызывающих некроз опухолевых клеток и клеток, поражённых вирусами [10]. В контрольной группе не наблюдали повышения в крови количества противовоспалительных цитокинов (таблица).

Число клеток костного мозга с повреждениями хромосом у мышей подопытной группы не превышало $0,65 \pm 0,07\%$, что намного ниже максимальной спонтанной частоты aberrаций (2,5%) у лабораторных белых мышей. В контрольной группе число aberrаций клеток костного мозга до-

стигало $3,1 \pm 0,05\%$, что подтверждает снижение длины теломер и повышение уровня провоспалительных цитокинов в крови.

Заключение

У белых мышей в возрасте 1,5-2-х лет контрольной группы отмечали укорочение теломер, изменение количества цитокинов в крови и повышение числа клеток костного мозга с хромосомными изменениями. В группе мышей после применения инъекционного курса RecColE2 констатировали стабильность количественных гериатрических показателей, снижение иммунодефицитных состояний и старческих фатальных мутаций.

Библиографический список

1. Шуварин М.В., Савруков Н.Т. Некоторые экономические аспекты повышения продуктивности и срока использования молочных коров // Азимут научных исследований: экономика и управление. – 2019. – Т. 8, № 1(26). – С. 406-409. DOI: 10.26140/anie-2019-0801-0097.
2. Юдин Н.С., Ларкин Д.М. Происхождение, селекция и адаптация российских пород крупного рогатого скота по данным полногеномных исследований // Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2019. – №23 (5). – С. 559-568. DOI: 10.18699/VJ19.525.
3. Aviv A., Shay J.W. Reflections on telomere dynamics and ageing-related diseases in humans // Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci. – 2018. – № 373 (1741): 20160436. DOI: 10.1098/rstb.2016.0436.
4. Аязмов 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>.
5. Аязмов М.А. Штамм бактерий *B.subtilis* pbColE2 - продуцент гибридного колицина E2, используемый для получения ветеринарного препарата. Патент №2188233 от 27.08.2002.
6. Борисов В.И., Кожевников В.С. Укорочение теломер в лимфоцитах CD4+ и CD8+ ВИЧ-инфицированных больных ассоциировано с изменением их количества и соотношения // Бюллетень СО РАМН. – 2010. – Т. 30, № 2. – С. 109-113.
7. Реброва О.Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA. – М.: МедиаСфера. 2002. – 312 с.
8. Игнатьева Е.В., Юдин Н.С., Ларкин Д.М. Компиляция и функциональная классификация генов, ассоциированных с длиной теломер, у человека и других видов животных // Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2023. – № 27 (3). – С. 283-292. DOI: 10.18699/VJGB-23-34.
9. Chen J., Deng J.C., Zemans R.L. et al. Age-induced prostaglandin E₂ impairs mitochondrial fitness and increases mortality to influenza infection // Nat Commun. – 2022. – № 13. – P. 6759. DOI: ORG/10.1038/S41467-022-34593-Y.
10. Muñoz-Lorente M.A., Cano-Martin A.C., Blasco M.A. Mice with hyper-long telomeres show less metabolic aging and longer lifespans // Nat Commun. – 2019. – № 10. – P. 4723. DOI: org/10.1038/s41467-019-12664-x.

**THE RECOMBINANT COLICIN E2 EFFECT ON THE SOME GERIATRIC
PARAMETERS OF WHITE MICE AGED 1,5-2 YEARS**

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) effect on the some geriatric parameters of male white mice aged 1,5-2 years was studied. The drug was administered in the mice of the experimental group for 365 days subcutaneously at a dose of 25 mcg (0.25 cm³) in the first month once a week, in the next 11 months twice a month.*

It was found on the 365 day after the use of RecColE2 in the experimental group, the preservation of the telomere length of CD4+ lymphocytes, an increase in antiinflammatory cytokines, a decrease in prostaglandin E2 in the blood and the number of aberrations in bone marrow cells were noted.

Keywords: *aberrations, elderly white mice, geriatric properties, colicin E2, telomeres, cytokines.*