

На правах рукописи

Тихонов Георгий Игоревич

**ПОЛУЧЕНИЕ И ОЦЕНКА
БИОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ КОЛИЦИНА E2**

16.00.03. - ветеринарная микробиология, вирусология,
эпизоотология, микология с микотоксикологией и иммунологам
16.00.23 - биотехнология

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва 2004

Работа выполнена в Федеральном государственном образовательном учреждении высшего профессионального образования «Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии имени К.И. Скрябина».

Научные руководители: доктор биологических наук, профессор
Девришов Давудай Абдулсемедович;
кандидат ветеринарных наук **Аязов Михаил Андреевич.**

Официальные оппоненты: доктор биологических наук, профессор
Интизаров Михаил Михайлович;
доктор биологических наук, профессор
Рубан Евгений Александрович.

Ведущая организация: Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии им. Я.Р. Коваленко (ВИЭВ).

Защита состоится 12 мая 2004 г. в 15.30 часов на заседании диссертационного совета Д 220.042.01 в Московской государственной академии ветеринарной медицины и биотехнологии имени К.И. Скрябина (109472, Москва, ул. Академика Скрябина, 23. Тел. (095) 377-93-83).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке МГАВМиБ

Автореферат разослан «*8*» *апреля* 2004 г.

**Ученый секретарь
диссертационного совета**



Брылина В.Е.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Разработка эффективных и безопасных препаратов, предназначенных для животных при желудочно-кишечных болезнях, остается в настоящее время одной из актуальных проблем ветеринарной медицины. Широко применяемые с этой целью антибиотики вызывают побочные эффекты: возникновение антибиотикорезистентных штаммов микроорганизмов, развитие дисбиотических состояний кишечника, аллергические реакции, иммунодепрессию и др.

В связи с этим интерес представляет разработка новых антибактериальных препаратов, которые могли бы составить конкуренцию антибиотикам по эффективности, безопасности, отсутствию, побочного действия.

Таковыми препаратами, по сообщениям Гловера Д (1988), Харди.К (1990), Мейнелла Г. (1992) и др. являются колицины - антимикробные соединения, продуцируемые *E coli* и родственными бактериями и активные против патогенных и условно-патогенных бактерий. Почти все изученные до сих пор колицины представляют собой полипептиды с молекулярной массой от 90 до 1,5 кДа

Известно четыре механизма действия колицинов: образование каналов в плазматической мембране, через которые могут проходить ионы калия, водорода, что приводит к уменьшению мембранного потенциала и блокирует поглощение аминокислот; эндонуклеазная деградация ДНК; специфическое расщепление рибосомальной РНК, приводящее к подавлению белкового синтеза; подавление синтеза муреина, которое приводит к лизису клетки

Клетки, продуцирующие колицин, устойчивы к его летальному действию, благодаря синтезу низкомолекулярного белка иммунности, кодируемого Col-плазмидой. Эти белки иммунности секретируются из клеток-продуцентов в виде комплекса с колицином.

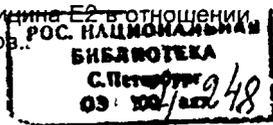
Учитывая полезные свойства колицинов, мы пришли к выводу, что при лечении и профилактике желудочно-кишечных болезней животных целесообразно применять препараты биологического происхождения, обладающие комбинированным антиоксидантным, антимикробным и иммуностимулирующим действием-

Цель и задачи исследований.

Целью настоящей работы являлось усовершенствование методов получения и очистки колицина E2 и оценка его лечебно-профилактической эффективности при желудочно-кишечных болезнях телят.

Для решения были поставлены следующие задачи:

1. Разработать методы получения и очистки колицина E2.
2. Определить биологические свойства колицина E2 *in vivo* и *in vitro*.
3. Изучить антибактериальную активность колицина E2 в отношении патогенных и условно-патогенных микроорганизмов.



4. Оценить лечебно-профилактическую эффективность колицина E2 при желудочно-кишечных болезнях телят.
5. Разработать рекомендации по применению колицина E2.

Научная новизна..

Получен рекомбинантный штамм *B subtilis* pVcolE2 - продуцент гибридного колицина E2.

В результате проведенных исследований была изучена трансформация структурного гена *E. coli* K12 в клетке бактерии *B. subtilis*. Было установлено, что миниклетки, которые образуются при асимметричном делении мутантов *E. coli* K12, не содержат геномную ДНК, но могут содержать плазмидную ДНК родительской клетки. При этом Col-плазмиды транслируются с образованием полипептидов.

Установлено, что колицин E2 состоит из двух полипептидных субъединиц * - собственно бактериоцина с молекулярной массой 68 кДа и белка иммуности с молекулярной массой 10 кДа. Колицин E2 проникает через клеточные мембраны бактерий матричного штамма *E. coli* K12, а также штаммов *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Haemophilus*, *Streptococcus*, вызывает эндонуклеазную деградацию бактериальной ДНК, т.е. не отличался видовой специфичностью при общей высокой бактерицидности.

Исследовано действие гибридного колицина E2 на процесс инфицирования клеток культуры ПЭК герпес вируса третьего типа (штамм Румын) возбудителя инфекционного ринотрахеита крупного рогатого скота.

Впервые проведена комплексная оценка возможности использования колицина E2 в ветеринарной практике в качестве профилактического и терапевтического средства при желудочно-кишечных болезнях новорожденных телят.

Учитывая, что колицин E2 является эффективным антибактериальным препаратом в отношении патогенных и условно-патогенных микроорганизмов, предложено применение колицина E2 в комплексе с симптоматическими средствами лечения.

Практическая и теоретическая значимость работы.

Сконструирован гибридный штамм *Bacillus subtilis* pVColE2 - продуцент колицина E2, обладающего антибактериальными и антиоксидантными свойствами. Штамм депонирован и зарегистрирован во Всероссийской коллекции микроорганизмов ГУ Зонального НИИСХ Северо-Востока им. Н.В. Рудницкого под номером В-771.

Показано, что колицин E2 обладает высокой лечебно-профилактической эффективностью при острых желудочно-кишечных болезнях молодняка крупного рогатого скота.

Установлено, что эффективной профилактической дозой колицина E2 для телят является 20 мг на 10 кг живой массы при внутримышечном его применении в течение 4-6 дней. Терапевтический эффект для больных новорожденных телят проявляется в дозе 20 мг на 10 кг веса при внутримышечном его применении в течение 6-8 дней.

Полученный колицин Е2 зарегистрирован Ветфармбиосоветом Департамента ветеринарии Минсельхозпрода РФ (протокол №3 от 06.06.2000 г. 001157-ОП).

Разработана схема применения препарата при желудочно-кишечных и респираторных заболеваниях сельскохозяйственных и домашних животных.

Составлено и утверждено временное наставление по применению колицина Е2 в ветеринарии (в порядке широких производственных испытаний 2001-2004 гг): Одобрено Ветфармбиосоветом Департа. ветеринарии Минсельхоза РФ (протокол №3 от 06.06.2000 г.) 001157-ОП. Утв. Департа. ветеринарии Минсельхоза России 12.03.2001 за № 13-4-03/0039.

Внедрена в производство схема применения колицина Е2 с профилактической и терапевтической целью.

Результаты изучения используются практическими ветеринарными врачами Российской Федерации при лечении и профилактике болезней животных.

Подготовлен и утвержден комплект нормативно-технической документации на препарат колицин Е2.

Разработаны практические рекомендации по использованию колицина Е2 при желудочно-кишечных болезнях телят.

Апробация работы: основные положения диссертации были доложены и обсуждены на IX и XI Международных ветеринарных конгрессах (Москва, 2001,2003); Международной научно-практической конференции «Нейроинфекции: бешенство, губкообразная энцефалопатия крупного рогатого скота, Крейтцфелда - Якоба и другие прионные болезни; листериоз, болезнь Ауэсжк болезнь Тешена» (Покров, 2001); Международной научной конференции «Актуальные проблемы развития животноводства» (Львов, 2003); научно-практической конференции «Биотехнология на рубеже веков: проблемы и перспективы» (Киров, 2001).

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Результаты исследования генетической цепи по конструированию штамма-продуцента колицина Е2, синтеза и очистки колицина Е2.
2. Результаты изучения биологических свойств препарата.
3. Результаты изучения лечебно-профилактического действия колицина Е2 при желудочно-кишечных болезнях телят.

Объект и структура диссертации. Основной текст работы изложен на 129 страницах машинописного текста. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, собственных исследований, обсуждения полученных результатов, выводов, практических предложений, библиографического списка (103 отечественных и 35 зарубежных авторов), приложений. Диссертация иллюстрирована 21 таблицей и 12 рисунками.

СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Материалы и методы исследований

Работа выполнена на базе НИЛИПиБ при МГАВМиБ им. К.И. Скрябина, лаборатории ветеринарной иммунологии ГУ Зональный НИИСХ Северо-Востока им. Н.В. Рудницкого (г. Киров), а также хозяйств Московской, Воронежской и Кировской обл.

Рекомбинантный штамм *B subtilis* pVcolE2 получали по методу Youngman P с соавт. (1985). Донором плазмиды pColE2-P9, детерминирующей синтез колицина E2, являлся штамм *E coli* BZB 2125. Плазмиды pBR322 использовалась в качестве основы для конструирования новых векторов.

В работе использовали колицин E2, производства ГУ Зональный НИИСХ Северо-Востока им. Н.В. Рудницкого, который представляет собой жидкий препарат белково-полипептидной природы с молекулярной массой 78 кДа

Опыты по определению острой токсичности колицина E2 проводили на 300 беспородных белых мышах массой 18-20 г. Препарат вводили животным внутримышечно, в дозах от 500 до 34000 мг/кг ЛД₅₀ вычисляли по методу Ашмарина И П и Воробьева А А (1962)

Исследование кумулятивных свойств препарата проводили на 120 белых мышах по методу Улановой И.П (1970). Коэффициент кумуляции вычисляли по методу Каган Ю.С. и Станкевич В В. (1968).

Для выявления отдаленных последствий влияния колицина E2 на организм животных исследовали эмбриотоксичность и тератогенность препарата на 160 беспородных белых мышах массой 18 - 20 г

Мутагенную активность колицина E2 определяли по методу Форда и Хамертона (1956) на 50 белых мышах линии С 57 .В 1/6

Определение влияния колицина E2 на микроорганизмы проводили по методу Ковалева В. Ф. с соавт. (1988).

Лизоцимную активность колицина определяли по методу Дорофейчук А Г. (1972), бактерицидную - по методу Чернушенко Е.Ф (1978).

Антиоксидантную активность колицина определяли в опытах на 80 телятах по содержанию продуктов окисления липидов по методу Коробейникова Э Н (1989) Активность супероксиддисмутазы определяли по методике С. Чевари с соавт. (1985).

Изучение действия колицина E2 на организм здоровых телят провели на 100 животных 1-2-х месячного возраста. У телят брали кровь для исследования фагоцитарной, бактерицидной активности Сыворотки крови и гематологических показателей.

Изучение лечебно-профилактической эффективности колицина E2 провели на 105 новорожденных телятах.

На первом этапе исследований сформировали 4 группы клинически ослабленных телят-аналогов 1-3-дневного возраста - по 10 голов в опытных группах, и 15 голов - в контрольной. Животным первой группы

колицин E2 вводили по 20 мг/10 кг живой массы 1 раз в день в течение 4 дней, внутримышечно; животным второй группы - 20 мг/10 кг 1 раз в день внутримышечно в течение 5 дней; животным третьей группы - 20 мг/10 кг 1 раз в день внутримышечно в течение 6 дней. Телятам контрольной группы вводили физраствор.

Срок наблюдения за клиническим состоянием телят составлял 20 дней. Профилактическая эффективность колицина E2 оценивалось по общему состоянию телят, отсутствию или наличию и характеру диареи, характеру температурной реакции.

На втором этапе исследований было создано 2 группы телят-аналогов - опытная и контрольная, по 25 и 15 голов, соответственно. -

Телятам опытной группы с профилактической целью внутримышечно вводили колицин E2 шестикратно, 1 раз в день (через 2 часа после рождения, а затем 5 дней подряд), из расчета 20 мг препарата на 10 кг живой массы. Телятам контрольной группы с профилактической целью никаких препаратов не применяли.

Для оценки терапевтической эффективности колицина было сформировано 2 группы телят, по 25 голов в каждой, у которых отмечали диарею, повышение температуры тела, угнетение, отказ от корма. Телята опытной группы получали колицин E2 в дозе 20 мг/10 кг живой массы внутримышечно 1 раз в день в течение 6 суток.

У телят опытных и контрольных групп определяли гематологические показатели по общепринятой методике и проводили количественный и качественный учет микроорганизмов фекалий в соответствии с методическими рекомендациями по выделению и идентификации условно-патогенных энтеробактерий и сальмонелл при острых кишечных заболеваниях молодняка сельскохозяйственных животных (1990).

Действие колицина на бактериальные клетки патогенных и условно-патогенных микроорганизмов изучали с помощью методов электронной микроскопии.

Антибиотикочувствительность и колициночувствительность выделенных микроорганизмов определяли диско - диффузионным методом.

Статистическая обработка полученных данных проведена с помощью стандартных программ на ПЭВМ.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Получение рекомбинантного штамма *B.subtilis* pVcoIE2 - продуцента гибридного колицина E2

С помощью генно-инженерных методов нами сконструирован штамм *Bacillus subtilis*, продуцирующий колицин E2.

На первом этапе была сконструирована гибридная плазида pVCoIE2. Хозяином исходной плазмиды pCoIE2-P9 являлся штамм *E.coli* BZB 2125.

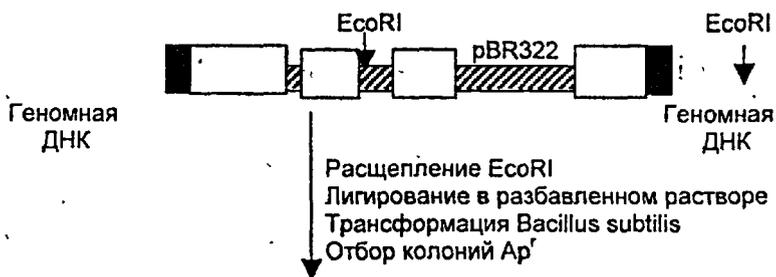
Рестрикцию сайта PstI, детерминирующего устойчивость к ампициллину, проводили ферментом *EcoR1*.

В результате была получена некоњугативная и немобилизуемая плаزمида pVCo1E2, детерминирующая синтез колицина E2 штаммом *V. subtilis*.

На втором этапе осуществляли получение плазмидного клона *V. subtilis*, который содержит участок геномной ДНК *E. coli* K12. Для этого осуществляли лигирование продуктов расщепления при низкой концентрации ДНК *E. coli* для перевода фрагментов в кольцевую форму и дальнейшей трансформации в штамм *Bacillus subtilis*.

Рекомбинационную интеграцию последовательностей pBR322 в геномную вставку Tn 917 В; *subtilis* проводили по методике Youngman P., Zuber P., Perkins J.B.

На рис. 1 показана схема получения плазмидного клона в *V. subtilis*, который содержит участок геномной ДНК *E. coli*.



Р и с . 1 . Получение плазмидного клона *V. subtilis*, содержащего участок геномной ДНК *E. coli* K12

В результате проведенных исследований был получен рекомбинантный штамм *V. subtilis* pVCo1E2, по морфологическим и биохимическим свойствам не отличающийся от исходного, устойчивый к ампициллину в концентрациях до 120 мкг/мл, тетрациклину - до 170 мкг/мл и бриллиантовой зелени - до 70 мкг/мл, соответственно.

В процессе культивирования *V. subtilis* pVCo1E2 гибридные белки высвобождаются в среду, облегчая быструю очистку больших количеств колицина E2. Выход гибридного колицина составляет до 10 мг/мл.

Гибридный колицин E2 имеет молекулярную массу 78 кДа и состоит из двух полипептидных субъединиц - собственно бактерицина с молекулярной массой 68 кДа и белка иммунности с молекулярной массой 10 кДа.

Для выделения колицина E2 матричный штамм культуры выращивали на специально подобранной питательной среде в течение 24 часов при 37°C при отработанных режимах аэрации и соответствующей скорости вращения мешалки.

В результате проведенных исследований было установлено, что гибридный колицин содержит активные и неактивные фракции. Актив-

ные фракции колицина E2 с белком иммунности молекулярным весом 78 кДа обладают высокой р-галактозидазной и бактерицидной активностью.

Оценка биологических свойств колицина E2

Определение острой токсичности колицина E2.

Для определения острой токсичности колицина E2 препарат вводили мышам внутримышечно, в нарастающих дозах - от 500 до 34000 мг/кг (табл. 1)

1. Результаты исследования острой токсичности колицина E2.

№ группы	Количество животных	Доза, (мг/кг)	Выжило		Погибло	
			Гол	%	Гол	%
1	30	500	30	100	0	0
2	30	1000	30	100	0	0
3	30	4000	30	100	0	0
4	30	8000	18	60	12	40
5	30	12000	15	50	15	50
6	30	16000	10	33,3	20	66,7
7	30	22000	9	30	21	70
8	30	28000	1	3,3	29	96
9	30	34000	0	0	30	100
Контроль	30	-	30	100	0	0

Было установлено, что в группах животных, которым вводили колицин E2 в дозах от 500 до 4000 мг/мл, гибель их не отмечалась. Отказ от корма и воды, угнетение, снижение двигательной активности, нарушение функции желудочно-кишечного тракта выявлены в группах, где животные получали 8000-34000 мг/кг колицина E2, гибель животных наступала через 72 часа. При вскрытии павших животных отмечали катаральное воспаление слизистой оболочки кишечника, кровенаполнение печени, почек, органов дыхания, пищеварения и сердца.

Таким образом, колицин E2 в дозах до 4000 мг/кг не вызывает отклонений в поведении и клиническом состоянии животных.

При исследовании состояния внутренних органов на семи поперечных разрезах плода, как и при исследовании скелета, не выявлено отклонений от нормы (табл. 2).

2. Влияние колицина E2 на состояние плодов в ходе беременности белых мышей

Доза препарата, мг/кг	Тератогенное действие					
	Состояние внутренних органов			Внешний осмотр		
	Количество плодов	Токсическая дистрофия печени		Количество плодов	Аномалии	
		Абс. кол-во	%		Абс кол-во	%
1276	71	1	1,40	105	1	0,95
638	87	1	1,15	107	1	0,93
127	70	1	1,42	99	2	2,02
Контроль	69	1	1,44	93	2	2,15

Показателем тератогенности служило число плодов с уродствами (в процентах по отношению к общему числу живых плодов). Количество случаев аномалий развития плодов как в опыте, так и в контроле не превышало физиологической нормы.

Второй этап - исследование влияния колицина E2 на постнатальное развитие мышат. В результате проведенных исследований было установлено, что общая эмбриональная смертность мышей в опытных группах была в 2 раза ниже, чем в контрольной.

Исследование фармакологической активности колицина E2.

Данные, полученные при введении колицина E2 в разных дозах белым мышам показали, что все исследуемые дозы способствуют повышению бактерицидной активности сыворотки крови (табл. 3).

Наилучшие показатели были в группе животных, которым вводили колицин E2 в дозе 10,0 мг/кг. Эта доза обеспечивала наибольший процент увеличения бактерицидной и фагоцитарной активности.

3. Влияние колицина E2 на бактерицидную и фагоцитарную активность сыворотки крови и лейкоцитов белых мышей.

Препарат	Доза, мг/кг	Бактерицидная активность, %		Фагоцитарная активность после окончания опыта	
		до начала опыта	после окончания опыта	Фагоцитарный индекс	Фагоцитирующие лейкоциты, %
Колицин E2	5,0	17,5±4,4	18,5±1,6	2,21±0,31	30,3±1,27
Колицин E2	10,0		24,7±2,1	2,73±0,34	37,4±1,51
Колицин E2	15,0		23,5±0,8	2,76±0,37	35,8±0,98
Дилудин	2,0		21,7±2,2	2,79±0,4	37,0±1,10
Контроль	—		18,0±1,6	2,4±0,23	30,5±1,2

Аналогичные результаты получены и при исследовании лизоцимной активности сыворотки крови (табл. 4).

4. Влияние колицина E2 на лизоцимную активность сыворотки крови белых мышей

Препарат	Доза, мг/кг	Лизоцимная активность, %	
		до постановки опыта	после постановки опыта
Колицин E2	5,0	22,7±2,1	27,6±2,2
Колицин E2	10,0	24,0±1,5	30,5±2,0
Колицин E2	15,0	22,6,1±2,0	25,3±0,9
Дилудин	2,0	21,4±3,1	24,3±2,0
Контроль	-	23,1±1,2	23,8±2,3

Лизоцимная активность сыворотки крови была достоверно выше у мышей, которым вводили колицин E2 в дозе 10,0 мг/кг.

Действие колицина E2 на бактериальные клетки изучали методом негативного контрастирования в электронном микроскопе марки IEM-

100СХ, при увеличении 50000 (рис 2)

При исследовании антибактериальной активности препарата установили, что минимальная подавляющая концентрация колицина находится в пределах 5,8 - 10,2 мкг/мл для тест-культуры *P aeruginosa* Habs 01 и 2,44 - 3,91 мкг/мл - для тест-культуры *E coli* ATCC 25922.



Рис 2. Действие колицина E2 на проницаемость клеточной стенки *Pseudomonas aeruginosa*. Заметно разрушение клеточной стенки бактерии и нарушение ее проницаемости

Активность колицина в отношении тест-штаммов бактерий представлена на рис 3

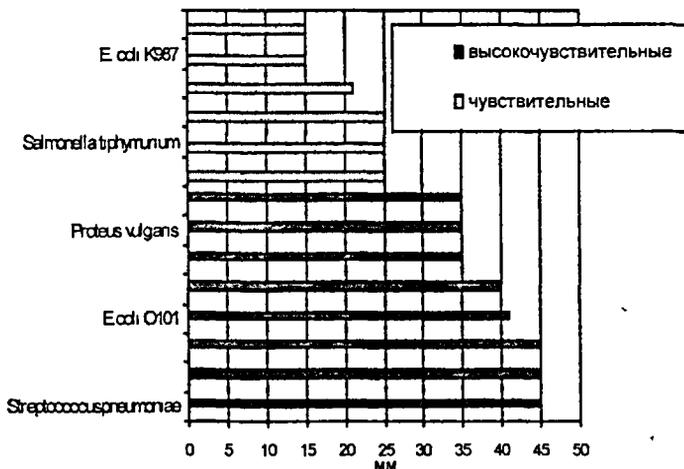


Рис 3 Активность колицина E2 in vitro в отношении тест-штаммов микроорганизмов

После внутримышечного введения колицина E2 пятидневным телятам в дозе 20,0 мг/кг уровень гемоглобина повысился на $18,0 \pm 2,0$ «г/л, бактерицидная активность повысилась на 5,2% активность β -лизинов увеличилась на 2%, по сравнению с контролем (табл 5)

5. Профилактическая эффективность колицина Е2 при смешанных инфекциях

Группа, количество голов	Заболело ОРЗ		Заболело ЖКИ		Динамика показателей неспецифической резистентности					
	голов	%	голов	%	Бактерицидная активность, %		Процент фагоцитоза		Лизоцимная активность, %	
					до начала	после окончания	до начала	после окончания	до начала	после окончания
Опыт, 50	1	2,0	0	0	27,5±3,2	33,5±3,4	57,3±5,5	71,5±6,6	23,8±2,1	32,1±3,1
Контроль, 50	7	14,0	8	16,0	26,7±2,0	22,5±5,0	59,0±6,1	63,7±6,2	23,0±2,2	24,3±3,0

У 25-дневных телят после введения препарата содержание Т-лимфоцитов увеличилось на 9%, а общая фагоцитарная активность - на 1,9%, соответственно, по сравнению с контролем. При этом сохранность телят повысилась на 45%.

Профилактическая эффективность колицина Е2 при желудочно-кишечных болезнях телят составила 100%, при острых респираторных заболеваниях - 98 %.

В опытной группе заболеваемость животных снизилась, в целом, на 28%, бактерицидная активность сыворотки крови у телят опытной группы увеличилась на 6 %, фагоцитарная - на 14,2%, лизоцимная - на 8,5%

Процент фагоцитирующих лейкоцитов у телят опытной группы после окончания опыта возрос до 70,7±7,5 % (P £ 0,05). В контрольной группе эти показатели составляли, соответственно, 59,2±5,3 и 62,7±6,0 %. Лизоцимная активность у телят опытной группы после окончания эксперимента возросла на 35,7 %, количество гемоглобина - на 11,8 и 6,41 %, соответственно, по сравнению с контролем.

У телят опытной группы прирост живой массы увеличился на 5,7%, по сравнению с контролем. После четырёхкратного введения колицина телятам в дозе 20,0 мг/кг, через 30 суток животные достигали физиологического развития возрастных аналогов.

При анализе гематологических показателей экспериментальных животных следует отметить, что количество гемоглобина у телят опытной группы при ЖКИ увеличивалось на 12,3%, при ОРЗ содержание гемоглобина увеличивалось на 12,6%, по сравнению с контролем.

Результаты опыта по определению зависимости динамики состояния организма ослабленных телят от кратности применения колицина E2 представлены на рис. 4.

Продолжительность
болезни, сут.

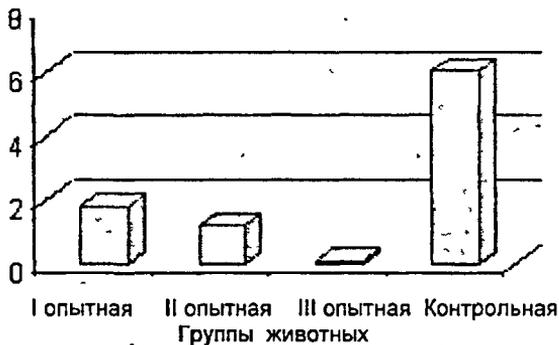


Рис. 4. Продолжительность болезни у телят исследуемых групп

Среди телят, получавших колицин E2 в течение 5 дней, наблюдалось кратковременное расстройство пищеварения в первые 1-2 дня после окончания применения препарата.

У телят третьей группы, получавших колицин E2 в течение 6 дней, профилактическая эффективность составила 100 %, в то время как в контрольной группе наблюдалось развитие диареи средней и тяжелой степени тяжести в 100-% случаев. На 2-5 сутки жизни развивалась диарея с клиническими признаками интоксикации и длилась 5-7 суток, один теленок пал.

У телят контрольной группы продолжительность болезни, в среднем, составила около 6 сут.

При последующем наблюдении в течение месяца во всех случаях дисфункций кишечника у телят опытных групп не отмечалось.

Таким образом, колицин E2 обладает высокой профилактической и терапевтической эффективностью при ЖКИ и ОРЗ.

Антиоксидантная активность колицина E2 in vitro.

Антиоксидантная активность колицина E2 изучалась в опытах по влиянию препарата на процесс инфицирования клеток в культуре почек эмбриона коровы (ПЭК) герпес-вирусом штамма "Румын" - возбудителя инфекционного ринотрахеита крупного рогатого скота.

Было установлено, что колицин в концентрациях 5, 10, 15 и 20 мкг на 1 мл значительно замедлял и ослаблял процесс дегенерации зараженной культуры клеток и не вызывал процесса отслоения клеточной культуры, что свидетельствовало о способности исследуемого антиок-

сиданта тормозить процесс вирусного инфицирования в культуре. Оптимальными концентрациями колицина по его способности тормозить процесс инфицирования зараженной герпес-вирусом культуры клеток ПЭК являлись 15 и 20 мкг.

В контроле наблюдали дегенерацию клеток ПЭК, зараженных герпес-вирусом, которая начиналась с периферии клеточного пласта и характеризовалась поражением вирусом клеток на 3 сутки. Клетки принимали звездообразную форму и группировались в виде плоских синцитий, содержащих по 10-25 ядер. На 4 сутки после заражения дегенерированный клеточный пласт отслаивался в виде крупных хлопьев.

Следовательно, колицин E2 является активным ингибитором процесса инфицирования клеток ПЭК вирусом. Наблюдалось возрастание ТЦД₅₀ для клеток, обработанных колицином в разных концентрациях, по сравнению с контрольными зараженными культурами, соответственно, в 100, 300, 450 и 520 раз.

Полученные данные представляют интерес для изучения возможности применения колицина в качестве препарата для борьбы с вирусными заболеваниями животных.

При исследовании 150 проб сывороток крови крупного рогатого скота хемилюминесцентным способом было установлено, что при температуре 39,0°С проявляется минимальный антиоксидантный эффект колицина, который увеличивается пропорционально повышению температуры, а при достижении концентрации 20 мг максимальное антиокислительное действие начинает проявляться уже при 37,0°С.

Было установлено, что колицин E2 в дозе 20 мкг/мл значительно повышал количество перекиси водорода в лейкоцитах, подавлял образование внеклеточных и стимулировал образование внутриклеточных активных форм кислорода, от которых зависит гибель бактерий в лейкоцитах, что указывает на положительный эффект колицина E2, т. к. повышение уровня перекиси водорода в клетках крови ведет к образованию "перекисного взрыва" в лейкоцитах, что влечет за собой быструю гибель фагоцитированных бактерий различных видов

Таким образом, мы установили, что механизм действия колицина E2, в отличие от обычных колицинов, состоит не только в разрушении оболочки бактериальных клеток и эндонуклеазной деградации нуклеиновых кислот микроорганизмов, но и в образовании "перекисного взрыва" в лейкоцитах организма животных, что вызывает гибель как нефагоцитированных, так и фагоцитированных бактерий. Кроме того, под действием колицина E2, образование внутриклеточных активных форм кислорода лежит в основе повышения бактерицидной активности лейкоцитов здоровых животных.

Антиоксидантная и иммуногенная активность колицина E2 в производственном опыте.

Для определения антиоксидантной и иммуногенной активности колицина были сформированы 2 группы телят разного возраста - опыт-

ная (87 голов) и контрольная (56 голов), у которых наблюдались признаки респираторных и желудочно-кишечных болезней

Телят контрольной группы лечили симптоматически орально растворами Лерса и Стартина, сердечно-сосудистыми средствами (кокарбоксилазой, кофеином), применяли гентамицин и линкоспектин, а также сыворотку против колибактериоза, в соответствии с наставлениями Телятам опытной группы вводили колицин в дозе 20 мг на 10 кг веса внутримышечно 1 раз в сутки в течение 3-5 суток, и сыворотку против колибактериоза

В контрольной группе на 5 сутки пало 12 телят, в опытной - 1 теленок. Средняя продолжительность заболевания в контрольной группе составила 14,5 дней, в опытной - 3,8 дней. На 20-е сутки после лечения в контрольной группе наблюдались рецидивы болезни у 5 животных.

У телят контрольной группы уровень альбумина был 28 %, а в опытной группе - 47 %, количество супероксиддисмутазы в сыворотке крови телят опытной группы составило 184 ЕД, в контрольной группе - всего лишь 32 ЕД, что указывает на серьезные нарушения антиоксидантной системы организма. Применение колицина не снижало титров антител против E coli и ротавируса телят

У телят опытной группы уровень Ig класса G1 в сыворотке крови, в среднем, повысился на 1,6 г/л, Ig G2 - на 2,0 г/л ($P < 0,05$) Количество гемоглобина у телят опытной группы увеличивалось, в среднем, на 12,3 %, по сравнению с контролем.

На основании полученных результатов нами было сделано заключение, что колицин обладает антиоксидантным и иммуностимулирующим действием на организм телят и сокращает сроки лечения животных.

Определение профилактической эффективности колицина E2 при желудочно-кишечных болезнях новорожденных телят

Для определения профилактической эффективности колицина E2 при желудочно-кишечных болезнях новорожденных телят были сформированы 2 группы телят-аналогов - опытная и контрольная, по 25 и 15 голов, соответственно. Телятам опытной группы внутримышечно вводили колицин E2 шестикратно, 1 раз в день, из расчета 20 мг препарата на 10 кг живой массы. Телятам контрольной группы с профилактической целью никаких препаратов не применяли.

В результате проведенных исследований было установлено, что использование колицина E2 обеспечивало 100%-ный профилактический эффект при желудочно-кишечных болезнях новорожденных телят (табл 6)

**6. Профилактическая эффективность колицина E2
при желудочно-кишечных болезнях новорожденных телят.**

№ пп	Группа животных	Кол-во животных, гол	Доза (мг/10 кг)	Продолжительность курса, сут	Заболело		Профилактическая эффективность, %
					голов	%	
1	Опытная	25	20	6	—	—	100
2	Контрольная	15	—	—	7	46,7	—

Телята опытной группы хорошо развивались, имели блестящий шерстный покров, были более активными в поведении и приеме корма, что подтверждается результатами контрольного взвешивания телят. У телят опытной группы привесы составили от 310,0 до 450,0 г в сутки, тогда как у телят контрольной группы привесы не превышали 230,0 г (от 180,0 до 230,0).

Из 15 телят контрольной группы заболело 7 голов на 2-3 сутки после начала постановки опыта. У больных телят отмечалась диарея, обезвоживание организма, угнетение, отсутствие аппетита. Заболеваемость телят контрольной группы составила 46, 7 %.

У телят опытной группы на 3 день с начала постановки опыта обнаруживали *P.vulgaris* в концентрации 10^6 м.к., однако к 14 дню исследований эти бактерии элиминировали из кишечника, а количество лакто- и бифидобактерий возрастало до 10^9 - 10^{10} м к/г фекалий. У телят контрольной группы обнаруживали энтеропатогенные штаммы *E. coli* в концентрации 10^7 м.к, *P.vulgaris*, *K pneumonia*, *C.freundii* на фоне дефицита лакто- и бифидобактерий.

Таким образом, профилактическая эффективность колицина E2 при желудочно-кишечных болезнях новорожденных телят составила 100%, при введении его в дозе 20 мг/10 кг 1 раз в день в течение 6 дней подряд. Препарат способствует элиминации из желудочно-кишечного тракта телят патогенных и условно-патогенных микроорганизмов и не ингибирует рост и размножение полезных бактерий.

**Оценка терапевтической эффективности колицина E2
при желудочно-кишечных болезнях новорожденных телят**

Для определения терапевтической эффективности колицина E2 были сформированы 2 группы телят-аналогов - опытная и контрольная, по 25 голов в каждой.

В опытную и контрольную группы отбирались телята 2-5-дневного возраста, у которых отмечались признаки диареи.

Телятам опытной группы внутримышечно вводили колицин E2 из расчета 20 мг препарата на 10 кг живой массы, 1 раз в день 6 дней подряд. Телятам контрольной группы с лечебной целью применяли гентамицин, согласно наставлению (табл. 7).

7. Терапевтическая эффективность колицина E2 при желудочно-кишечных болезнях новорожденных телят

№ пп	Группа животных	Кол-во животных, гол	Выздоровело		Длительность болезни, сут.	Терап. эффективность, %
			голов	%		
1.	Опытная	25	23	92,0	5	92
2.	Контрольная	25	17	68,0	8	68

Было установлено, что терапевтическая эффективность колицина E2 при желудочно-кишечных болезнях телят составила 92 %. Из 25 телят опытной группы у 23 животных выздоровление наступило на 5 день после начала применения препарата. За весь период наблюдений у 2 телят отмечались жидкие фекалии, однако падежа в опытной группе животных не было. Заболевание у телят опытной группы протекало в более легкой форме, чем у контрольных животных.

В контрольной группе терапевтическая эффективность гентамицина составила 68 %, а продолжительность болезни была на 3 дня больше, чем у телят опытной группы. После окончания эксперимента телята были вялыми, плохо поедали и усваивали корм, имели тусклый шерстный покров и отставали в росте. У 7 телят отмечались клинические признаки болезни и после окончания опыта 2 теленка пали на 9 и 10 сутки с начала постановки опыта.

У телят опытной группы на 3 день с начала постановки опыта в фекалиях обнаруживали повышенное содержание *P. vulgaris*, уровень которого снижался до допустимой концентрации на 14 день исследований. Количество лакто- и бифидобактерий возрастало во все дни исследований и на 14 день с начала постановки опыта достигало 10^8 - 10^9 м. кл/г фекалий.

Из фекалий телят контрольной группы были выделены *E. coli*, *P. vulgaris*, *P. mirabilis*, *K. pneumonia*, *S. freundii*, *S. aureus*, *P. aerogenosa*. На 3 день с начала постановки опыта в фекалиях не обнаруживали лакто- и бифидобактерий, в то время как количество патогенной и условно-патогенной микрофлоры было выше допустимых норм. Выделенные от 5 телят на 3, 7 и 14 дни *E. coli* дали положительную РА с антиадгезивной сывороткой K99 и обладали гемолитическими свойствами. Выделенные от 2 телят *S. aureus* дали положительный результат в реакции с плазмокоагулазой. На 14 день исследований нормализации состава кишечной микрофлоры у телят контрольной группы не наблюдалось.

Анализируя полученные результаты, можно заключить, что применение колицина E2 с лечебной целью ведет к восстановлению нормального биоценоза пищеварительного тракта телят за счет подавления размножения и элиминации из организма патогенных и условно-патогенных бактерий и повышения концентрации лакто- и бифидобактерий.

Терапевтическая эффективность колицина составила 92 %, при даче препарата в дозе 20 мг на 10 кг живой массы, 1 раз в день 6 дней подряд

Сравнительная оценка эффективности колицина E2 с другими биопрепаратами

Сравнительная оценка антибактериальных свойств колицина E2 и различных антибиотиков, проведенная *in vitro*, показала его высокую активность в отношении бактерий, вызывающих развитие дисбактериозов (рис. 5).

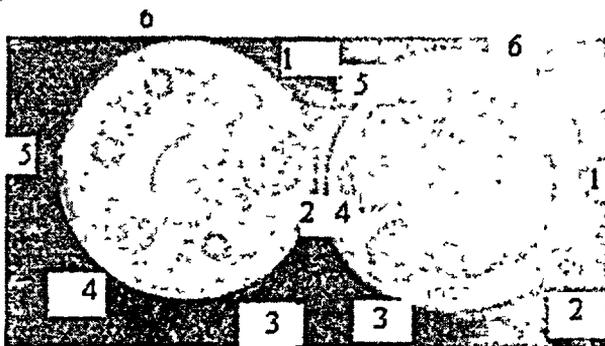


Рис 5 Активность колицина E2 в отношении *Salmonella choleraesuis* и *Enterobacter*

(диск с колицином в центре чашки Петри, 1-офлоксацин, 2-полимиксин, 3-неомицин, 4-гентамицин, 5-хлорамфеникол, 6-тетрациклин)

Было установлено, что колицин E2 по активности превышал офлоксацин и др антибиотики широкого спектра действия и был наиболее эффективным в отношении *S pneumoniae*, *E coli* 010, *S aureus*, *S choleraesuis*, *Enterobacter*, *P. mirabilis*, *S. haemolyticus*

По действию на *E. coli* 026, *E. coli* K99, *S. typhimurium*, *P. vulgaris* колицин E2 соответствовал активности офлоксацина.

Таким образом, активность колицина E2 *in vitro* в отношении перечисленных грамотрицательных бактерий полностью коррелирует с высокой эффективностью препарата *in vivo*, что подтверждается данными микробиологических исследований материала от больных телят.

ВЫВОДЫ

1. Разработан усовершенствованный метод получения и очистки колицина E2 из гибридного штамма *Bacillus subtilis* pBcolE2, представляющий собой полипептид с молекулярной массой 78 кДа

2. Колицин E2 безвреден для животных, не обладает эмбриотоксичностью и тератогенностью, обладает антиоксидантными свойствами и

антимикробной активностью-в отношении *Pseudomonas aeruginosa* в концентрации >3,9 мкг/мл, *Esherihia coli* - в концентрации >1,9 мкг/мл, повышает бактерицидную и лизоцимную активность сыворотки крови на 20-30 %, а также способствует возрастанию в 2 раза фагоцитарной активности лейкоцитов.

3. Колицин E2 угнетает рост и размножение возбудителей желудочно-кишечных болезней телят из семейства *Enterobacteriaceae* - *E. coli*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Salmonella*, *Enterobacter*, *Citrobacter*, а так же - *S. aureus*, *S. pneumoniae*, способствует их элиминации, стимулирует развитие лакто- и бифидобактерий.

4. Лечебно-профилактическая эффективность" колицина E2 при желудочно-кишечных болезнях телят, составила 92-100-% при внутримышечном введении в дозе 20 мг/10 кг массы тела, 1 раз в день в течение 6 дней.

5. Экономический эффект от использования колицина E2 составил 28,8 руб. на теленка, что в 8 раз дешевле базовой схемы лечения.

СВЕДЕНИЯ О ПРАКТИЧЕСКОМ ИСПОЛЬЗОВАНИИ ПОЛУЧЕННЫХ НАУЧНЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ

1. Сконструирован гибридный штамм, *Bacillus subtilis* pBColE2 - продуцент колицина E2, обладающего антибактериальными и антиоксидантными свойствами, который депонирован и зарегистрирован во Всероссийской коллекции микроорганизмов ГУ Зонального НИИСХ Северо-Востока им. Н.В. Рудницкого под номером В-771.

2. Составлено Временное наставление по применению-колицина E2 в ветеринарии (в порядке широких производственных испытаний 2001-2004 гг), утв. Департ. ветеринарии Минсельхоза России 12.03 2001 за № 13-4-03/0039.

3. Внедрена в производство схема применения колицина E2. С целью профилактики желудочно-кишечных болезней новорожденных телят препарат лрименяют сразу после рождения в дозе 20 мг на 10 кг живой массы телят внутримышечно, 1 раз в сутки в течение 4-6 дней. С лечебной целью при желудочно-кишечных болезнях телят колицин E2 применяют при первых проявлениях клинических признаков заболевания в, дозе 20 мг на 10 кг живой массы телят внутримышечно, 1 раз в сутки в течение 6 дней. Схема применения внедрена в хозяйствах Моевской, Кировской, Воронежской и др. областях.

4. Разработана нормативно-техническая документация на колицин E2. Промышленный регламент на производство колицина E2. Утв. 18.01.2002г. Директором ГУ зональный НИИ сельского хозяйства Северо-Востока им.Н.В.Рудницкого. Технические условия на препарат-колицин E2. ТУ 9337-010-00008064-01. - 2001.-11с. Согласованы с Департаментом ветеринарии Минсельхоза РФ.

5. Составлены акты производственных испытаний колицина E2 в хозяйствах (приложение).

РЕКОМЕНДАЦИИ ПО ИСПОЛЬЗОВАНИЮ НАУЧНЫХ ВЫВОДОВ

1. В связи с антибиотикоустойчивостью выделяемых от новорожденных телят микроорганизмов для лечения и профилактики желудочно-кишечных болезней животных следует применять препарат колицин Е2.
2. С целью профилактики желудочно-кишечных болезней новорожденных телят рекомендован колицин Е2 в дозе 20 мг на 10 кг живой массы телят внутримышечно сразу после рождения, 1 раз в сутки в течение 4-6 дней.
3. С лечебной целью при желудочно-кишечных болезнях новорожденных телят колицин Е2 рекомендуется применять при первых появлениях клинических признаков заболевания в дозе 20 мг на 10 кг живой массы телят внутримышечно, 1 раз в сутки в течение 6 дней.
4. Учитывая, что колицин Е2 является эффективным антибактериальным препаратом в отношении патогенных и условно-патогенных микроорганизмов, рекомендуется применять колицин Е2 в комплексе с симптоматическими средствами лечения.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО МАТЕРИАЛАМ ДИССЕРТАЦИИ

1. **Маслов С.А., Азямов М.А., Тихонов П.И.** Разработка питательной среды из непищевого сырья для получения ветеринарного препарата на основе гибридного колицина Е2 /Материалы Международной научно-практической конференции «Нейроинфекции: бешенство, губкообразная энцефалопатия крупного рогатого скота, Крейтцфелда - Якоба и другие прионные болезни; листбриоз, болезнь Ауэски, болезнь Тешена».- Покров.- ВНИИВВиМ,- 2001. - 0.226-227.
2. **Тихонов Г.И., Азямов М.А.** Получение гибридного колицина Е2 (сообщение I) /Сборник материалов научно-практической конференции «Биотехнология на рубеже веков: проблемы и перспективы».- Киров.- 2001.-С.70-72.
3. **Азямов М.А., Тихонов Г.И.** Антиоксидантный препарат нового поколения - колицин Е2 /Сборник материалов научно-практической конференции «Биотехнология на рубеже веков: проблемы и перспективы».- Киров.- ВГТУ.- 2001.- С. 4-5.
4. **Тихонов Г.И.** Влияние колицина Е2 на остеорепарацию при переломах длинных трубчатых костей у собак / Материалы IX Московского Международного ветеринарного конгресса. - М.: Ассоциация практикующих ветеринарных врачей. - 2001, - С. **146-147.**
5. **Азямов М.А., Тихонов Г.И., Девришов Д.А.** Получение гибридного колицина Е2 (сообщение II) /Ветеринарная медицина.- ООО «Агровет».-2002.-№1.-С13-14.

6. Тихонов Г.И., Слесаренко Н.А. Оценка эффективности колицина E2 при переломах длинных трубчатых костей у собак /Ветеринарная медицина.- ООО «Агровет».- 2002.- № 1. - С. 17-19.

7. Тихонов П.И., Акимочкин А.И., Остренская М.Е., Заблоцкая Т.В. Оценка лечебной эффективности препарата колицинE2 при кишечных заболеваниях телят, вызванных ассоциацией энтеропатогенной микрофлоры /Ветеринарная медицина,- ООО «Агровет».- 2002.- № 2.-С. 20-21.

8. Тихонов П.И. Результаты применения колицина E2 при кишечных заболеваниях телят, вызванных ассоциацией энтеропатогенной микрофлоры /Материалы Международной научной конференции «Актуальные проблемы развития животноводства».- Львов.-Науковий вісник Львівської академії ветеринарної медицини іМені С.З. Гжицького.- 2003. - С.63-69.

Сдано в производство 5 04 2004 г. Ризограф. Тираж 100 Заказ 149

Издательско-полиграфический отдел
ФГОУ ВПО МГАВМиБ им. К.И. Скрябина.

109472, Москва, ул. Академика Скрябина, 23

· 0178