

УДК 57.084:547.96

ИЗУЧЕНИЕ ЭМБРИОТОКСИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ОДНОЦЕПОЧЕЧНОЙ ВЫСОКОПОЛИМЕРНОЙ РНК ИЗ SACCHAROMYCES CEREVISIAE**¹Ямковой В.И., ²Ямковая Т.В., ¹Мамаев А.Л., ¹Пыхтина М.Б., ¹Поляков Л.М.**¹*НИИ биохимии, Новосибирск, e-mail: vitalang2@mail.ru;*²*ООО «Виталанг», Новосибирск*

В данной работе исследовано влияние амфифильной одноцепочечной высокополимерной РНК *Saccharomyces cerevisiae*, введенной в период с 1 по 19 день беременности, на показатели репродуктивной функции крыс. Установлено, что в предлагаемой терапевтической дозировке (1 мг/кг) препарат не оказывал влияния на количественные характеристики желтых тел, мест имплантации, на показатели пре- и постимплантационной смертности. В то же время введение препарата незначительно повышало число кровозлияний во внутренние органы и ткани эмбрионов, что может быть связано с повышенным действием препарата на проницаемость сосудов. В дозировке, десятикратно превышающей предлагаемую дозу, препарат оказывал неблагоприятное действие на процесс эмбрионального развития, которое проявлялось в увеличении количества плодов с гематомами, аномалиями развития внутренних органов и скелета.

Ключевые слова: дрожжи *Saccharomyces cerevisiae*, амфифильная высокополимерная РНК, эмбриогенез крыс, олеиновая кислота

INVESTIGATION OF EMBRYOTOXIC PROPERTIES OF HIGH POLYMERIC SINGLE-CHAIN RNA FROM SACCHAROMYCES CEREVISIAE**¹Yamkovoy V.I., ²Yamkovaya T.V., ¹Mamaev A.L., ¹Pykhtina M.B., ¹Polyakov L.M.**¹*Institute of Biochemistry, Novosibirsk, e-mail: vitalang2@mail.ru;*²*LLC «Vitalang», Novosibirsk*

The influence of high-polymeric single-stranded amphiphilic RNA from *Saccharomyces cerevisiae* administered on days 1-19 of gestation on reproductive function in rats investigated. It is found that administration of the drug at proposed therapeutic dosage (1 mg/kg) had no effect on the quantitative characteristics of corpora lutea, implantation sites, and did not lead to pre- and post-implantation mortality. Introduction of the drug slightly increased the number of hemorrhages in organs and tissues of embryos, which can be associated with increased vascular permeability. In the dosage tenfold higher than the proposed dose, the drug has an adverse effect on the process of embryonic development which manifests itself as increased number of fetuses with hematomas and developmental abnormalities of internal organs.

Keywords: yeasts *Saccharomyces cerevisiae*, amphiphilic high-polymeric RNA, embryogenesis in rats, oleic acid

Рибонуклеиновые кислоты являются важнейшим компонентом клетки и выполняют в ней множество различных функций. Кроме основных видов РНК, в клетке присутствуют многочисленные виды минорных РНК, которые, как выяснилось, играют регуляторную роль в самых разнообразных клеточных процессах [1–3]. В этой связи исследование компонентов минорной РНК, особенно ее высокополимерной фракции, представляет несомненный интерес. Ранее в ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» из дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* были выделены и изучены препараты высокополимерной РНК, получившие название Полирибонат и Ридостин. Препараты состоят из гидрофильных молекул, хорошо растворимых в воде. Полирибонат обладает противовирусными свойствами, стимулирует гемопоэз, является иммуномодулятором и адьювантом, используется в ветеринарии [4]. Ридостин – препарат двуспиральной РНК и высокополимерной РНК, также является индуктором синтеза интерферона, стимулирует гуморальный иммунный ответ и анти-

ген-реактивные Т-лимфоциты, активизирует функцию макрофагов и нейтрофилов, обладает иммуoadьювантными свойствами при совместном использовании с антибактериальными и противовирусными вакцинами, а также является стимулятором роста животных [5].

Недавно нами было описано получение принципиально иной фракции амфифильной одноцепочечной высокополимерной РНК из пекарских дрожжей, содержащей короткие двуспиральные участки [6]. В основе данной технологии детергентный лизис дрожжевых клеток при повышенной температуре в присутствии олеиновой кислоты. Препарат был назван Виталанг-2.

Основные характеристики препарата:

– растворимость в воде – удовлетворительная (в отличие от гидрофильного Полирибоната, растворяющегося в воде в течение нескольких секунд, препарат Виталанг-2 растворяется в воде при комнатной температуре только через 30–60 мин при периодическом перемешивании), водный раствор мылкий, нерастворенные крупинки скользкие;

– весовая экстинкция, D_{260} , ед./мг – 10–18,5; содержание КРФ, % ≤ 10 ; прирост КРФ за 1 сут. при 25°C, % $\leq 0,5$; спектральные отношения: $D_{230} / D_{260} - 0,25-0,55$; $D_{250} / D_{260} - 0,86-0,94$; $D_{280} / D_{260} - 0,40-0,65$.

Наличие в препарате связанной олеиновой кислоты приводит к снижению его растворимости в воде. Однако по этой же причине препарат обладает способностью проникать через биологические мембраны и проявляет более высокую биологическую активность [6, 7]. Транспортированные с помощью олеиновой кислоты, обладающей в анионной форме амфифильными свойствами, молекулы РНК воспринимаются как некие вирусоподобные частицы, которые могут вызывать в организме животного индукцию биосинтеза эндогенного интерферона γ .

В испытаниях *in vivo* на модели гибридных мышей препарат Виталанг-2 дозозависимо увеличивает массу лимфоидных органов (тимуса и селезенки), количество клеток в них, а также содержание в плазме крови иммуноглобулинов класса М и G, как показано в работе [8]. Это позволяет использовать препарат Виталанг-2 для увеличения неспецифической резистентности к инфекционным заболеваниям. Помимо этого, данный препарат подавляет клеточный иммунный ответ, что делает перспективным его применение в лечении заболеваний, характеризующихся гиперчувствительностью замедленного типа, например туберкулеза и проказы.

В работе [9] было проведено исследование интерферогенной активности препарата Виталанг-2. Установлено, что в организме мышей препарат действительно вызывает дозозависимое увеличение концентрации гамма-интерферона. Также в работе [9] испытывали противовирусную активность препарата *in vitro* на модели вирусного заболевания (вирусной диареи – болезни слизистых оболочек ВД-БС) крупного рогатого скота. На линии клеток коронарных сосудов теленка показано, что введение препарата в дозе 5 мг/мл вызывает ингибирование вируса ВД-БС. Таким образом, данный препарат в перспективе может быть использован для лечения вирусного гепатита С человека.

Целью настоящей работы является изучение эмбриотоксических свойств препарата Виталанг-2 на модели беременных самок крыс.

Материалы и методы исследования

Выделение высокополимерной РНК из пекарских дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* проводили, как описано в работе [6]. Свежие прессованные пе-

карские дрожжи (1 кг) суспендировали в кипящей воде (2 л), содержащей 45 г олеиновой кислоты, оттитрованной 20 мл 2,5 М NaOH. Суспензию кипятили 40 мин при 98–102°C и частом перемешивании. По мере упаривания общий объем доводили кипящей водой до 3 л. По окончании экстракции в горячую суспензию добавляли кипящую воду до 4,5 л, перемешивали и отстаивали при комнатной температуре в течение 22 ч.

Далее высаливали РНК следующим образом: отстоявшийся супернатант отделяли декантацией, добавляли 620 г NaCl и свежekiпяченую воду до 3,5 л. Суспензию перемешивали до полного растворения соли и инкубировали при комнатной температуре в течение 22 ч. Образовавшийся осадок высокополимерной РНК отделяли центрифугированием, промывали последовательно 3М раствором NaCl и 96% этанолом. Окончательную экстракцию высокополимерной РНК осуществляли экстракцией дистиллированной водой, разливали препарат в стеклянные виалы по 1,5 мл (30 мг РНК) и проводили лиофильную сушку препарата. Стерилизацию проводили, прогревая закупоренные виалы при 110°C в течение 1 часа.

Исследование эмбриотоксических свойств препарата Виталанг-2 проводили на самках крыс Wistar с массой 230–260 г. Животные содержались в стандартных условиях вивария при естественном освещении на сбалансированном пищевом рационе. Самок, находящихся в стадии эструса, подсаживали на сутки к самцам в соотношении 2/1. Оплодотворение регистрировали на основе анализа влагалищных мазков.

Для исследования отобрали 54 беременные самки, которые были разделены на три экспериментальные группы, две опытные и одна контрольная, по 18 самок в каждой группе. Доза препарата Виталанг-2 для крыс первой опытной группы составила 1 мг/кг массы тела (предлагаемая терапевтическая доза) и 10 мг/кг массы для второй опытной группы. Препарат растворяли в воде для инъекций и вводили интраназально с 1 по 19 день беременности в объеме 80 мкл (по 40 мкл в каждый носовой проход). Контрольным животным вводили эквивалентный объем воды для инъекций.

Токсическое действие препарата на развитие эмбрионов исследовали на 20-й день беременности после эвтаназии животных. В ходе патоморфологического исследования регистрировали следующие показатели: количество желтых тел беременности, мест имплантации, живых и погибших эмбрионов, массу эмбрионов, плаценты, кранио-каудальный размер плодов, внешние аномалии развития, число и локализацию гематом.

На основании полученных данных рассчитывали предимплантационную и постимплантационную смертность плодов, суммарную массу плаценты и плодов у каждой беременной самки, количество подкожных кровоизлияний (в процентах). Предимплантационную и постимплантационную смертность рассчитывали по рекомендациям, изложенным в методических руководствах [10, 11].

Статистическую обработку экспериментальных данных проводили с помощью пакета программ «Statgraphics, Vers.5.0» (Statistical Graphics Corp., USA). Сравнения двух групп из совокупностей с нормальным распределением проводили с помощью t-критерия Стьюдента. Статистически значимыми считались различия данных при $p < 0,05$.

Результаты исследования и их обсуждение

В результате исследования было обнаружено, что беременность в группах крыс, которым препарат Виталанг-2 вводили в течение 19 дней в дозах 1 мг/кг и 10 мг/кг, сохранялась в 67% и 89% случаев, соответственно. В контрольной группе данный показатель составил 61%. В случаях, когда беременность не развивалась, у животных отмечали признаки эндометрита. Увеличение сохранности беременности крыс в опытных группах может быть следствием повышения иммунитета животных в результате введения препарата, которое может приводить к улучшению состояния слизистой оболочки эндометрия [12].

Введение препарата Виталанг-2 самкам крыс в течение 19 дней беременности не приводило к снижению массы тела животных, не оказывало существенного влияния на количественные характеристики желтых тел, мест имплантации, а также на показатели предимплантационной и постимплантационной смертности.

Также введение препарата с 1 по 19 день беременности не приводило к значимым изменениям массы плаценты, среднего количества плодов на самку, их массы и кранио-каудального размера. При макроскопическом осмотре плодов крыс в контрольной группе животных не было обнаружено аномалий развития. В то же время в первой и второй опытных группах было зарегистрировано появление эмбрионов с кровоизлияниями, вплоть до множественных гематом в разных участках тела (6,3% и 5,5% соответственно). Кроме того, были

обнаружены такие единичные аномалии, как окрашенный позвоночник (возможно, вследствие гематомы), бледные кожные покровы, обозначенная сетка сосудов на голове, нарушение пропорций тела (увеличение размера головы). Общее количество указанных нарушений составило 6,6% и 7,1% для первой и второй опытной группы, соответственно.

Частота встречаемости гематом во внутренних органах и тканях эмбрионов, обнаруженная при вскрытии самок крыс первой и второй опытной группы, составила 13,8 и 17,5% соответственно, при контрольном уровне показателя в 11,4%. В частности, были обнаружены единичные кровоизлияния в печени и легких, что может свидетельствовать о влиянии препарата на проницаемость сосудов. Морфологическое исследование плодов крыс первой опытной группы (1 мг/кг) не выявило достоверных отличий параметров развития скелета плодов от показателей контроля. Однако введение препарата в дозе 10 мг/кг приводило к появлению у плодов аномалий развития черепа и грудины, вызванных преимущественно нарушениями процессов оссификации. Отсутствие центров оссификации (менее 2 точек) в грудине плодов крыс второй группы (10 мг/кг) было зарегистрировано у 34,0%, в контроле – у 26,8%. В 4,3% случаев у плодов опытной группы обнаружены центры чрезмерной оссификации грудины (6 костей при варианте нормы от 2 до 4) при полном отсутствии таких нарушений в контрольной группе. У плодов крыс опытной группы в 27,7% случаев наблюдали недоразвитие костей черепа (в контрольной группе их количество составило 4,58%).

Влияние введения препарата Виталанг-2 в дозе 1 и 10 мг/кг массы на показатели репродуктивности и эмбриотоксичность ($M \pm m$)

Показатели	Контроль	1 мг/кг	10 мг/кг
Количество желтых тел на одну самку	11,2 ± 0,7	12,9 ± 0,6	11,9 ± 0,4
Количество мест имплантации на одну самку	8,9 ± 1,1	8,6 ± 0,7	11,2 ± 0,7
Количество живых плодов на одну самку	8,5 ± 1,1	8,1 ± 0,7	10,2 ± 0,8
Количество мертвых плодов на одну самку	0,4 ± 0,1	1,0 ± 0,3	0,5 ± 0,2
Предимплантационная гибель, %	13,8 ± 3,7	24,5 ± 7,3	28,1 ± 4,7
Постимплантационная гибель, %	4,3 ± 2,0	6,1 ± 2,2	10,2 ± 4,0
Масса плода, г	2,4 ± 0,1	2,5 ± 0,1	2,6 ± 0,1
Кранио-каудальный размер, мм	31,5 ± 0,5	31,8 ± 0,4	31,9 ± 0,6
Масса плаценты, г	0,58 ± 0,30	0,57 ± 0,01	0,58 ± 0,02
Внешний осмотр плодов:			
количество обследованных плодов;	87	122	127
– из них с аномалиями развития,	0	8	9
абс%	0	6,6	7,1
Плоды с подкожными гематомами, %	0	6,3	5,5

Заключение

На основании полученных данных можно заключить, что ежедневное введение препарата Виталанг-2 в предлагаемой терапевтической дозировке (1 мг/кг) самкам крыс с 1 по 19 день беременности не влияло на количественные характеристики желтых тел, мест имплантации, на показатели пре- и постимплантационной смертности. Введение препарата незначительно повышало число кровоизлияний во внутренние органы и ткани эмбрионов, что может быть связано с повышенным действием препарата на проницаемость сосудов. В дозировке 10 мг/кг массы препарат оказывал неблагоприятное влияние на процессы эмбрионального развития, проявляющиеся увеличениями количества плодов с гематомами и аномалиями развития внутренних органов и скелета.

Список литературы

- Galasso M., Sandhu S.K., Volinia S. MicroRNA expression signatures in solid malignancies // *Cancer J.* – 2012 – Vol. 18, № 3. – P. 238–43.
- Sioud M. Recent advances in small interfering RNA sensing by the immune system // *N. Biotechnol.* – 2010. – Vol. 27, № 3. – P. 236–42.
- Tesfaye D., Salilew-Wondim D., Gebremedhn S., Soheli M.M., Pandey H.O., Hoelker M., Schellander K. Potential role of microRNAs in mammalian female fertility // *Reprod. Fertil. Dev.* – 2016. – Vol. 29, № 1. – P. 8–23.
- Соколов В.Д., Андреева Н.Л., Соколов А.В. Иммуностимуляторы в ветеринарии // *Ветеринария.* – 1992. – № 7–8. – С. 49–50.
- Кнорроз М.Ю., Попова О.М., Давыдова А.А. и др. Сравнительное изучение противовирусной активности природных дуспиральных РНК при экспериментальном клещевом энцефалите // *Вопросы вирусологии.* – 1985. – Т. 30, № 6. – С. 697–700.
- Ямковая Т.В., Ямковой В.И., Панин Л.Е. Выделение и анализ биологической активности высокополимерной РНК из пекарских дрожжей // *Сибирский научный медицинский журнал.* – 2012. – Т. 32, № 6. – С. 60–68.
- Пат. 2496783 РФ. Легко проникающий через биологические мембраны мылкий амфифильный индуктор интерферона γ // Ямковая Т.В., Колесникова О.П., Загребельный С.Н. и др. опублик. 27.10.2013. *Бюл.* (30).
- Ямковая Т.В., Колесникова О.П., Ямковой В.И., Козлов В.А., Панин Л.Е. Иммунотропная активность мылкой амфифильной высокополимерной рнк из пекарских дрожжей // *Сибирский научный медицинский журнал.* – 2013. – Т. 33, № 4. – С. 42–48.
- Ямковая Т.В., Глотова Т.И., Колесникова О.П., Семенова О.В., Гаврилова Е.Д., Гойман Е.В., Ямковой В.И., Панин Л.Е. Легко проникающий через биологические мембраны мылкий амфифильный индуктор интерферона γ – перспективный препарат для лечения гепатита с человека. // *Сибирский научный медицинский журнал.* – 2014. – Т. 34, № 1. – С. 15–20.
- Методы экспериментального исследования по установлению порогов действия промышленных ядов на генеративную функцию с целью гигиенического нормирования. Методические рекомендации: № 1744-77. – М., 1978.
- Хабриев Р.У. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. – М., 2005. – С. 832.
- Кузовкова Е.В., Вансовская И.В., Колесникова О.П. и др. Выделение и иммуностимулирующая активность высокополимерной РНК из пекарских дрожжей // *Российский аллергологический журнал.* – 2009. – Т. 3, № 1. – С. 246.