

Адолина // Ветеринарный фармакологический вестник. – 2021. – № 1(14). – С. 88-95. – DOI 10.17238/issn2541-8203.2021.1.88.

15. Avau A. Therapeutic pPotential of interferon- γ and its antagonists in autoinflammation: Lessons from murine models of systemic juvenile idiopathic arthritis and macrophage activation syndrome/A. Avau, P. Mathys// Pharmaceuticals.–2015.–Vol.25.–No.8 (4).–P.793-815.doi: 10.3390/ph8040793.

16. Harrison G. Type I interferon genes from

the egg-laying mammal, *Tachyglossus aculeatus* (short-beaked echidna)/ G. Harrison, K.A. McNicol, E.M. Deane//Immunology and Cell Biology.-2004.-Vol.82.-P.112-118. DOI: 10.1046/j.0818-9641.2004.01230.x

17. Salmon H. Humoral and cellular factors of maternal immunity in swine/ H. Salmon, M. Berri, V. Gerdtz, F. Meurens// Developmental & Comparative Immunology.- 2009.- V.33.-I.3.-P.384-393.

18. Shapira S.D. Systems biology approaches to dissect mammalian innate immunity/ S.D. Shapira, N. Hacohen // Curr. Opin. Immunol.

УДК: 631.528.1: 577.15.01

DOI:10.17238/issn2072-2419.2021.3.94

ИССЛЕДОВАНИЕ МУТАГЕННОЙ АКТИВНОСТИ ПРЕПАРАТА НА ОСНОВЕ РЕКОМБИНАНТНОЙ ПРОТЕАЗЫ МИКРОМИЦЕТА ASPERGILLUS OSCHRACEUS BKM F-4104D

Шабунин С.В., академик РАН, д.вет.н., проф. (ORCID 0000-0002-2689-6998), Паршин П.А. д.вет.н., проф. (0000-0002-8790-0540), Востроилова Г.А., д. биол. н. (ORCID 0000-0002-2960-038X), Шабанов Д.И. – млад. науч. сотр.к лаборатории экспериментальной фармакологии (ORCID 0000-0002-1574-1317), Хохлова Н.А. – науч. сотр. лаб. экспериментальной фармакологии, (ORCID 0000-0001-6861-2554), Корчагина А.А.- млад. науч. сотр.лаб. экспериментальной фармакологии (ORCID 0000-0002-8561-417X)
ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский ветеринарный институт патологии, фармакологии и терапии»

Ключевые слова: рекомбинантная протеаза, мутагенность, микроядерный тест, полихроматофильные эритроциты, костный мозг, белые крысы. **Key words:** recombinant protease, mutagenicity, micronucleus test, polychromatophilic erythrocytes, bone marrow, white rats.



РЕФЕРАТ

В данном исследовании нами была оценена мутагенная активность препарата ПАО-1, содержащего в качестве действующего вещества обладающую фибринолитической активностью протеазу микромицета *Aspergillus ochraceus* BKM F-4104D, разработанный для терапии заболеваний молочной железы у крупного рогатого скота. Для этого нами было проведено изучение частоты полихроматических эритроцитов с микроядрами в костном мозге белых крыс породы Wistar (n=24). Исследовали цитогенетическую стабильность клеток костного мозга крыс после двух недель ежедневного подкожного введения ПАО-1 в дозах 460 мг/кг и 2300 мг/кг относительно показателей интактных животных и крыс, подвергнутых однократному внутрибрюшному введению экспериментального мутагена – митомицина С. В результате проведенного исследования нами не было выявлено статистически значимого изменения частоты встречаемости полихроматических эритроцитов с микроядрами, а также доли полихроматических эритроцитов при введении ПАО-1 в обеих исследуемых

дозах. Таким образом, нами не было выявлено изменения цитогенетической стабильности в полихроматофильных эритроцитах в костном мозге крыс при двухнедельном подкожном введении рекомбинантной протеазы микромицета *Aspergillus ochraceus* ВКМ F-4104D в дозе 460 мг/кг и 2300 мг/кг, относительно показателей интактных животных. Представленные данные могут являться свидетельством отсутствия у исследуемой протеазы мутагенных свойств. Работа выполнена при поддержке РНФ (проект № 20-16-00085)

ВВЕДЕНИЕ

В современной ветеринарии и медицине сохраняется проблема эффективно-го разрушения некоторых фибриллярных и глобулярных белков [1]. Внеклеточные протеолитические ферменты способны расщеплять фибриллярные белки, такие как кератин, эластин, коллаген, фибрин [2]. Было показано, что протеиназы некоторых грибов обладают различной неспецифической протеолитической активностью и способны гидролизовать белки [3]. Поэтому в последние годы особое внимание уделяется производству и очистке фибринолитических ферментов, которые имеют высокий потенциал в разрушении фибрина – основного полимера в сгустке тромба в кровеносных сосудах или небольших полых медицинских устройствах (таких как катетеры) [4]. Также использование фибринолитических ферментов может повысить биодоступность лекарственных препаратов при терапии акушерско-гинекологических патологий благодаря разрушению фибринозного экссудата в полости матки и сгустков казеина в протоках молочной железы [5]. В качестве действующего вещества такого препарата с фибринолитическими свойствами может выступать рекомбинантная протеаза микромицета *Aspergillus ochraceus* ВКМ F-4104D, что было показано в ряде исследований [3, 5]. Однако новые лекарственные субстанции должны быть проверены на их безопасность по отношению к животным, в том числе должна быть проведена оценка возможного мутагенного действия нового лекарственного средства [6].

В связи с этим целью данной работы являлось исследование мутагенных свойств препарата на основе рекомбинантной протеазы микромицета *Aspergillus ochraceus* ВКМ F-4104D при ее воздействии на организм крыс.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Экспериментальные животные. В качестве биологической тест-системы использовали белых крыс линии Wistar (n=24) массой тела $240 \pm 20,0$ г разведения вивария ФГБНУ «ВНИВИПФиТ». Подопытные животные содержались в стандартных условиях вивария (температура воздуха $+18-23^{\circ}\text{C}$, относительная влажность 45-60%). Доступ к воде и корму был свободным. Все процедуры с животными, предусмотренные в исследовании, были предварительно рассмотрены и одобрены на заседании биоэтической комиссии ФГБНУ «ВНИВИПФиТ» до начала экспериментальной работы и соответствовали правилам, принятым в European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and other Scientific Purposes (ETS 123), Strasbourg, 1986.

Объектом исследования являлся препарат на основе протеазы микромицета *Aspergillus ochraceus* ВКМ F-4104D (рабочее название ПАО-1), разработанный во ФГБНУ «ВНИВИПФиТ». В качестве препарата положительного контроля использовали Митомицин С Киова (Киова Хакко Когё Ко., Япония), содержащий в качестве действующего вещества митомицин.

Были сформированы следующие группы экспериментальных животных. Группой I (отрицательный контроль) являлись животные (n=6), которым вводили подкожно стерильный изотонический раствор натрия хлорида в объеме 0,5 мл ежедневно в течение 14 дней. Группа II – крысы получали ПАО-1 в дозе 460 мг/кг подкожно в объеме 0,5 мл ежедневно в течение 14 дней (n=6). Группа III – животным вводили ПАО-1 в дозе 2300 мг/кг аналогично группе II (n=6). В качестве положительного контроля использовали крыс (n=6), получивших однократную интраперитонеальную инъекцию митоми-

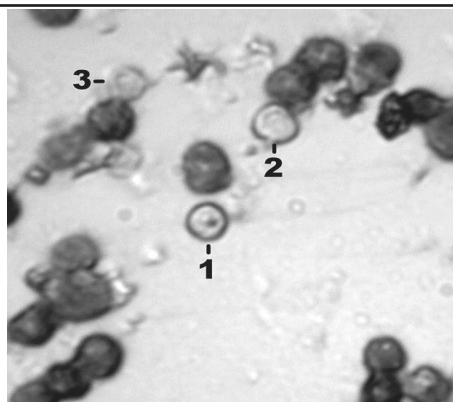


Рис. 1. Микрофотография клеток костного мозга крысы: 1 – полихроматофильный эритроцит с микроядром; 2 - полихроматофильный эритроцит; 3 – нормохромный эритроцит; увеличение $\times 1000$.

Таблица 1
Частота полихроматофильных эритроцитов с микроядрами в костном мозге крыс ($M \pm SE\%$, $n=24$)

Группа	Доля ПХЭ с микроядрами на 1000 ПХЭ, %	Доля ПХЭ от (НЭ+ПХЭ), %
I ($n=6$)	$0,42 \pm 0,15$	$44,98 \pm 0,42$
II ($n=6$)	$0,65 \pm 0,10$	$44,87 \pm 1,10$
III ($n=6$)	$0,55 \pm 0,15$	$45,41 \pm 0,41$
IV ($n=6$)	$2,52 \pm 0,25^*$	$42,94 \pm 1,57$

Примечание: * - статистически значимое отличие от негативного контроля при $p \leq 0,05$; $M \pm SE\%$ - среднее арифметическое $\pm$ стандартная ошибка.

цина С (ММС) в дозе 2 мг/кг (группа IV). Выведение крыс из эксперимента проводили через 24 ч после последней инъекции препарата путем передозировки углекислым газом в специальной камере.

Для определения мутагенных свойств использовали метод изучения частоты микроядер (микроядерный тест) полихроматофильных эритроцитов (ПХЭ) в костном мозге крыс, который широко признан в качестве эффективного метода [7]. Исследование частоты микроядер проводили после получения суспензии клеток костного мозга в буферном растворе Хенкса (рН 7,4) с добавлением 1% бычьего сывороточного альбумина [8]. Суспензию наносили на предметные стекла, далее препараты высушивали, фиксировали метанолом и окрашивали по Романовско-

му-Гимзе [7]. Изучение препаратов костного мозга проводили при увеличении $\times 1000$. Исследовали частоту микроядер на 1000 ПХЭ, всего изучали 2000 ПХЭ на животное. Также учитывали долю ПХЭ на 500 ПХЭ и нормохромных эритроцитов (НЭ), которая может быть использована в качестве маркера токсичности исследуемых препаратов [6].

Статистическую обработку данных проводили с помощью пакетов программы STADIA 8.0. Сравнение выборок проводилось с использованием непараметрического рангового χ -критерия Ван дер Вардена при уровне значимости $p \leq 0,05$. Полученные результаты представляли как среднее арифметическое (M) $\pm$ стандартная ошибка (SE).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Нами была проанализирована частота ПХЭ с микроядрами в костном мозге исследуемых животных (рис. 1). В результате проведенного исследования нами не было выявлено изменения частоты ПХЭ с микроядрами в группах II и III относительно данного значения у животных негативного контроля (группа I), которое составило $0,42 \pm 0,15\%$ (таблица 1). При этом частота ПХЭ с микроядрами в костном мозге крыс, получавших инъекции препарата ПАО-1 (группы II и III), была достоверно ниже этого показателя у крыс после инъекции митомицина С (группа IV), который был равен $2,52 \pm 0,25\%$. Также не обнаружено и изменение доли ПХЭ в костном мозге крыс всех исследуемых групп.

ОБСУЖДЕНИЕ

В ходе работы нами не было выявлено изменения цитогенетической стабильности клеток костного мозга крыс после введения препарата ПАО-1 на основе рекомбинантной протеазы микромицета *Aspergillus ochraceus* VKM F-4104D. Представленные данные согласуются с результатами других исследований, демонстрирующих отсутствие мутагенного действия фибринолитических протеаз, оценка мутагенности которых была произведена с помощью микроядерного теста и методом ДНК комет [9] или протеаз, с фибринолитической активностью, получаемых из продуктов ферментации соевых бобов, мутагенное действие, которых оценивалось с помощью микроядерного теста, исследования частоты хромосомных aberrаций и теста Эймса [10].

ВЫВОДЫ

Данные, полученные в эксперименте по выявлению изменения частоты встречаемости полихроматофильных эритроцитов в костном мозге крыс при двухнедельном подкожном введении препарата ПАО-1 на основе рекомбинантной протеазы микромицета *Aspergillus ochraceus* VKM F-4104D в дозе 460 мг/кг и 2300 мг/кг, относительно показателей животных негативного контроля, могут являться свидетельством отсутствия у исследуемой протеазы мутагенных свойств.

STUDY OF THE MUTAGENIC ACTIVITY OF THE DRUG BASED ON RECOMBINANT PROTEASE OF MICROMYCETE *ASPERGILLUS OCHRACEUS* VKM F-4104D

Shabunin S.V., Academician of the RAS, Doctor of Veterinary Sciences, Professor, Parshin P.A., Doctor of Veterinary Sciences, Professor, Vostroilova G.A., Doctor of Biological Sciences, Shabanov D.I. - laboratory researcher, Khokhlova N.A. - laboratory researcher, Korchagina A.A. - laboratory researcher, FSBSI "All-Russian Veterinary Research Institute of Pathology, Pharmacology and Therapy"

ABSTRACT

In this study, we assessed the mutagenic activity of the drug PAO-1, containing as an active ingredient the protease of the micromycete *Aspergillus ochraceus* VKM F-4104D, which possesses fibrinolytic activity, designed for the treatment of mammary gland diseases in cattle. Thus, we studied the frequency of polychromatic erythrocytes with micronuclei in the bone marrow of white Wistar rats ($n = 24$). We studied the cytogenetic stability of rat bone marrow cells after two weeks of daily subcutaneous administration of PAO-1 at doses of 460 mg/kg and 2300 mg/kg relative to the indicators of intact animals and rats subjected to a single intraperitoneal injection of an experimental mutagen mitomycin C. As a result of the study, we did not reveal a statistically significant change in the frequency of occurrence of polychromatic erythrocytes with micronuclei, as well as the proportion of polychromatic erythrocytes with the administration of PAO-1 at both studied doses. Thus, we did not reveal changes in the cytogenetic stability in polychromatophilic erythrocytes in the bone marrow of rats after a two-week subcutaneous injection of the recombinant protease of the micromycete *Aspergillus ochraceus* VKM F-4104D at a dose of 460 mg/kg and 2300 mg/kg, relative to the indicators of intact animals. The presented data may indicate the absence of mutagenic properties in the studied protease.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ramundo J. Enzymatic wound debridement / J. Ramundo, M. Gray. J.W. Ostomy //

- Contenance Nurs. – 2008. – №35(3). – P.273-280. DOI: 10.1097/01.WON.0000319125.21854.78.
2. Balami J.S. Thrombolytic agents for acute ischaemic stroke treatment: The past, present and future / J.S. Balami, R. Chen, B.A. Sutherland, A.M. Buchan // *CNS Neurol. Disord. Drug Targets*. – 2013. – Vol. 12(2). – P. 145–154.
3. Osmolovskiy A. A. Secretion of Proteinases with Fibrinolytic Activity by Micromycetes of the Genus *Aspergillus*. // A. A. Osmolovskiy, E. S. Zvonareva, V. G. Kreyer, N. A. Baranova, and N. S. Egorov // *Moscow University Biological Sciences Bulletin*. – 2018. – Vol. 73(1). – P. 39–42. DOI: 10.3103/S0096392518010066.
4. Choi J.H. Thrombolytic, anticoagulant and antiplatelet activities of codiase, a bifunctional fibrinolytic enzyme from *Codium fragile*. / J.H. Choi, K. Sapkota, S.E. Park, S. Kim, S.J. Kim // *Biochimie*. – 2013. – Vol. 95. – P. 1266–1277. DOI: 10.1016/j.biochi.2013.01.023.
5. Востроилова Г.А. Оценка противовоспалительной активности рекомбинантной протеазы микровицета *Aspergillus Ochraceus* на лабораторных животных / Г. А. Востроилова, Н. А. Хохлова, Ю. А. Чаплыгина, А. А. Корчагина, Т. И. Ермакова, П. А. Паршин // *Ветеринарный фармакологический вестник*. – 2020. – № 4(13). – С. 68–72. DOI: 10.17238/issn2541-8203.2020.4.68
6. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. / Под ред. А. Н. Миронова. М.: Гриф и К, 2012.
7. Hayashi M. The micronucleus test—most widely used in vivo genotoxicity test. / M. Hayashi // *Genes and Environ*. – 2016. – Vol. 38:18 – P. 1-9. DOI: 10.1186/s41021-016-0044-x.
8. Agarwal D.K. An improved chemical substitute for fetal calf serum for the micronucleus test. / D.K. Agarwal, L.K. Chauhan // *Biotech. Histochem*. – 1993. – №68(4). P. 187-188. DOI: 10.3109/10520299309104695.
9. da Silva M.M. Effect of acute exposure in swiss mice (*Mus musculus*) to a fibrinolytic protease produced by *Mucor subtilissimus* UCP 1262: An histomorphometric, genotoxic and cytological approach / M.M. da Silva, T.A. Rocha, D.F. de Moura, C.A. Chagas, F.C. de Aguiar, N.P. da Silva Santos, R.V. Da Silva Sobral, J.M. do Nascimento, A.C.L. Leite, L. Pastrana, R.M.P. Brandão Costa, T.P. Nascimento, A.L. Figueiredo Porto / *Regul Toxicol Pharmacol*. – 2019. – Vol.103. – P.282-291. DOI: 10.1016/j.yrtph.2019.02.009.
10. Wu H. Acute toxicity and genotoxicity evaluations of Nattokinase, a promising agent for cardiovascular diseases prevention / H. Wu, H. Wang, F. Xu, J. Chen, L. Duan, F. Zhang. // *Regul Toxicol Pharmacol*. – 2019. – Vol. 103. – P. 205-209. DOI: 10.1016/j.yrtph.2019.02.006.