

На правах рукописи

ЗАХАРОВА МАРИНА АЛЕКСАНДРОВНА

**ИССЛЕДОВАНИЕ СОДЕРЖАНИЯ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ И
ПОЛУЧЕНИЕ НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНОЙ ДНК ИЗ ГОНАД
ПРЕСНОВОДНЫХ РЫБ БАЙКАЛЬСКОГО РЕГИОНА**

Специальность 03.01.06 – Биотехнология
(в том числе бионанотехнологии)

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Улан-Удэ – 2012

Работа выполнена на кафедре «Биотехнология» ФГБОУ ВПО «Восточно-Сибирский государственный университет технологий и управления» (ФГБОУ ВПО «ВСГУТУ»)

Научный руководитель: Доктор биологических наук, профессор
Цыренов Владимир Жигжитович,
заведующий кафедрой «Биотехнология» ФГБОУ
ВПО «Восточно-Сибирский государственный
университет технологий и управления»

Официальные оппоненты: доктор биологических наук, профессор
Пронин Николай Мартемьянович,
ФГБУ Сибирский институт общей и
экспериментальной биологии СО РАН,
лаборатория паразитологии и экологии
гидробионтов

доктор технических наук, профессор
Чиркина Тамара Федоровна,
ФГБОУ ВПО «Восточно-Сибирский
государственный университет технологий и
управления», кафедра «Биоорганическая и
пищевая химия»

Ведущая организация:

Институт эпидемиологии и микробиологии государственного учреждения Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека Сибирского отделения РАМН.

Защита диссертации состоится «18» мая 2012 г. в 10 часов 00 минут на заседании Диссертационного совета ДМ 212.039.02 при ФГБОУ ВПО «Восточно-Сибирский государственный университет технологий и управления» по адресу: 670013, г. Улан-Удэ, ул. Ключевская, 40 В.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБОУ ВПО «Восточно-Сибирский государственный университет технологий и управления».

Автореферат разослан «16» апреля 2012 г

Ученый секретарь
диссертационного совета

Хамнаева Нина Ивановна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. В настоящее время достоверно показана биологическая активность нуклеиновых кислот различного происхождения при их применении в качестве лекарственных препаратов и БАД к пище, использовании в косметологии и для специального (детского, лечебного, спортивного) питания, а также для получения нуклеотидов, нуклеозидов, пуринов и пиримидинов. Для получения дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) используют различные сырьевые источники: ткани животных, микроорганизмы (биомасса дрожжей и непатогенных штаммов кишечной палочки пригодны и для производства ДНК и РНК для фармации), растения (наиболее богаты ДНК и РНК и содержат мало полисахаридов, полифенольных соединений и пигментов 3-7 дневные этиолированные (выращенные в темноте и лишённые хлорофилла) проростки семян. Для выделения ДНК и РНК для фармации пригодны кровь и мягкие ткани сельскохозяйственных животных и молоки промысловых рыб.

ДНК, из вышеперечисленных источников, может быть выделена в высокомолекулярной и низкомолекулярной формах. Применение высокомолекулярной ДНК в качестве БАД ограничено ее слабой растворимостью в воде, низкой биодоступностью, трудоемкой и многостадийной технологии выделения и требует дорогостоящего оборудования и реактивов. Низкомолекулярная ДНК (молекулярная масса $2-5 \times 10^5$ Да) является значительно более дешевой и доступной для технологического получения, также разрешена к применению как биологически активная пищевая добавка и обладает целым рядом лечебно-профилактических свойств, таких как повышение физической и умственной работоспособности, иммуномоделирующее, противовирусное, кардиопротекторное и противоопухолевое действие (Беседнова, Эпштейн, 2002). Среди иммуномодуляторов и противовирусных средств полученных из молок осетровых особое место занимают коммерческие препараты «Деринат» и «Ферровир». Они эффективны в отношении целого ряда ДНК- и РНК- вирусов. ДНК со сравнительно низкой молекулярной массой применяется в кардиологии при лечении ишемической болезни сердца, в онкологии при профилактике и лечении рака. С 1995 г. применяется препарат «Нуклеоспермат Натрия» для профилактики и лечения лейкопении при агранулоцитозе – самостоятельно или на фоне цитостатической терапии в онкологии (Реестр лекарственных средств).

Гонады лососевых, осетровых рыб и кальмаров являются основным источником получения низкомолекулярной ДНК. Молоки промысловых пресноводных видов рыб также могут служить источником нуклеиновых кислот, однако до настоящего времени недостаточно сведений о количественном содержании в них ДНК и ферментов, участвующих в ее деградации. Исследования нуклеолитических ферментов пресноводных видов рыб в основном посвящены изучению ДНК-аз пищеварительных органов и печени (Wu, Wang, Liu, 2008; Mogi, 2003; Yasuda, Takeshita, 2004). Например, ДНК-аза I, расщепляющая нативную ДНК по двуударному механизму, активируемая ионами Ca^{2+} и Mg^{2+} , была выделена из печени карпа и карася, а кислые дезоксирибонуклеазы - из печени и молок некоторых видов пресноводных и морских рыб (Амелина, 2005, 2006). Сведений о протеолитических и нуклеолитических ферментах молок пресноводных рыб в литературе не обнаружено.

Несмотря на большое количество разработок в этой сфере проблема поиска новых источников сырья остается актуальной.

Цель и задачи исследования. Целью данной работы было исследование гонад пресноводных видов рыб Байкальского региона на содержание нуклеиновых кислот, как перспективного сырья для получения низкомолекулярной ДНК.

Для достижения поставленной цели необходимо было решить следующие задачи:

- провести анализ содержания нуклеиновых кислот и белков в молоках пресноводных рыб и определить наиболее перспективный источник для получения комплекса ДНК;
- определить активности эндогенных нуклеаз и протеаз в гонадах пресноводных гидробионтов;

- получить низкомолекулярный комплекс ДНК из молок пресноводных рыб и изучить его фракционный состав;
- определить фармакологическую активность и острую токсичность комплексов ДНК из пресноводных рыб.

Научная новизна. Проведены исследования содержания нуклеиновых кислот в молоках 12 видов гидробионтов Байкальского региона, определены в них нуклеазные и протеолитические активности. Получен комплекс ДНК из молок пресноводных рыб. Проведена оценка на острую токсичность комплекса ДНК и ее безвредность. Выявлена фармакологическая активность одного из исследуемого комплекса ДНК.

Практическая значимость. Предложены способы использования гонад пресноводных рыб для получения БАВ и использования их в качестве сырья для БАД.

Разработан проект технической документации по получению комплекса ДНК из молок пресноводных рыб (технический регламент № 1 от 15.11.2011). Получены опытные образцы низкомолекулярной ДНК из молок пресноводных рыб.

Материалы исследований вошли в основу курса лекций для студентов специальности «Биотехнология» по следующим дисциплинам: «Химия БАВ», «Биотехнология лекарственных веществ». Результаты научных исследований внедрены в учебный процесс.

Работа поддержана грантом «Молодые ученые ВСГТУ 2009 – 2010 гг.».

Апробация работы. Основные положения диссертации были представлены и доложены на: конференции молодых ученых «Биология – наука 21 века» (Пушино, 2008); конференции молодых ученых общества биотехнологов России им. Ю.А. Овчинникова (Москва, 2008); международной научно-практической конференции «Качество как условие повышения конкурентоспособности и путь к устойчивому развитию» (Улан-Удэ, 2009); ежегодной научной конференции преподавателей, научных сотрудников и аспирантов ВСГТУ секция «Биотехнология» (Улан-Удэ, 2010), Вестник ПГФА (Пермь, 2011), Известия ТИНРО-центра (Тихоокеанский научно-исследовательский рыбохозяйственный центр, г Владивосток, 2011 г).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 11 печатных работ, в том числе 2 статьи в журналах, рекомендованных ВАК.

Объем и структура диссертации. Диссертация изложена на 130 страницах и состоит из введения, обзора литературы, описания материала и методов исследования, 2 глав, выводов, заключения и списка использованной литературы, включающего 121 наименование источника, в том числе и источники иностранных авторов. Работа иллюстрирована 22 рисунками и 13 таблицами.

ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Объектами экспериментальных исследований служили гонады 3 - 4 стадии зрелости следующих видов пресноводных рыб: омуля *Coregonus migratorius*, окуня *Perca Linne*, широколобки *Paracottus (leocottus)kessleri*, тайменя *Hucho taimen*, налима *Lota Oken*, язя *Leuciscus idus*, ельца *Leuciscus baicalensis*, хариуса *Thymallus baicalensis*, леща *Abramis brama*, ленка *Brachymystax lenok*, плотвы *Rutilus rutilus*, карася *Carassius auraris gibelio*, гаммарус, которые в замороженном виде доставляли в лабораторию. Образцы рыб вылавливали в осенне-весенний период в реках и озерах Бурятии. Хранение замороженного сырья при температуре -18° не превышал 3 мес.

Количественное содержание ДНК в сырье определяли по методу Дише, содержание РНК по методу Мейбаума (Северина, 1989). Определение биохимических свойств гидролизатов и комплексов ДНК проводили по общепринятым методам (Игнатъев, 1980).

Удельную активность протеолитических ферментов определяли в щелочной среде по скорости гидролиза казеина, а в кислой – гемоглобина (Каверзнева, 1971). Активность кислой и щелочной Са, Mg-зависимой ДНК-аз оценивали по количеству кислоторастворимых олигонуклеотидов, образующихся в процессе гидролиза нативной ДНК (Гафуров, 1999).

В качестве субстратов для определения протеолитической активности использовали казеин по Гаммерстену («Биолар», Латвия), эфирные субстраты: ТАМЭ, БТЭЭ («Sigma», США), нуклеазной – ДНК («ICN», США). При проведении электрофореза и высокоэффективной жидкостной хроматографии в качестве маркеров использовали наборы олигонуклеотидов pUC/Msp 1 и pBR 322/Alu 1 («СибЭнзим», Россия).

Для получения низкомолекулярной ДНК использовали метод, разработанный учеными ТИНРО-центра, который включает солевую экстракцию с последующим осаждением конечного вещества из раствора этиловым спиртом и удаление влаги сушкой на воздухе при комнатной температуре (Патент РФ № 915446).

Идентификацию комплексов ДНК осуществляли с помощью ВЭЖХ на хроматографе Agilent 1100 (США). Определение массовой доли ДНК в готовом комплексе осуществляли методом гель-электрофореза (Остерман, 1981).

Острую токсичность препаратов исследовали в соответствии с требованиями Фармакопеи (ГФ, 1987), а так же на простейших тест-организмах (угнетение процессов жизнедеятельности *Tetrahymena pyriformis*).

Анальгетическую активность данных соединений определяли по модели «уксусных корчей», на белых мышах массой 20-26 г. в соответствии с требованиями Фармакопеи в Пермской государственной фармацевтической академии (ПГФА) на кафедре «Фармакология» под руководством зав. кафедрой, профессора Котегова В.П.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Характеристика сырья по химическому составу, содержанию ДНК и активности эндогенных ферментов

На первоначальном этапе исследований проведен скрининг по содержанию нуклеиновых кислот в молоках пресноводных рыб (таблица 1). Показано, что наибольшее содержание ДНК обнаружено в молоках широколобки, омуля, окуня и тайменя. Эти данные легли в основу выбора гонад для получения низкомолекулярной ДНК, что основано на прямой зависимости процента выхода комплекса ДНК от содержания ДНК в молоках различных видов рыб. В икре пресноводных рыб содержание ДНК оказалось значительно меньше по сравнению с молоками для всех видов, кроме леща.

Таблица 1 - Содержание нуклеиновых производных в гонадах пресноводных рыб

Виды рыб	Гонады	Содержание ДНК, %	Содержание РНК, %
1	2	3	4
Широколобка	молоки	6,27± 0,56	1,65± 0,09
	икра	0,59± 0,04	-
Омуль	молоки	3,75 ± 0,26	0,67 ± 0,03
Окунь	молоки	3,73 ± 0,18	0,85 ± 0,04
	икра	0,57 ± 0,03	0,11 ± 0,01
Таймень	молоки	3,68±0,18	-
Елец	молоки	2,56± 0,12	0,52± 0,04
Карась	молоки	2,45±0,11	-
	икра	0,11±0,01	0,40±0,02
Язь	молоки	2,09 ± 0,10	1,18 ± 0,07
	икра	0,14 ± 0,01	-
Хариус	молоки	1,82±0,09	0,20±0,01
	икра	0,15±0,01	0,30±0,02
Плотва	молоки	1,4±0,085	0,09± 0,01
	икра	0,15±0,01	-

Продолжение таблицы 1

1	2	3	4
Налим	молоки	1,25±0,08	0,5±0,03
	икра	0,11±0,01	-
Ленок	молоки	1,18±0,09	0,09±0,01
	икра	0,21±0,02	-
Лещ	молоки	0,96 ±0,06	0,16 ± 0,01
	икра	0,84 ± 0,02	0,08 ± 0,01

Содержание ДНК в молоках пресноводных рыб тех же стадий зрелости существенно ниже, чем в морских: кета-7,8%, горбуша-5,0%, сельдь-4,5%, треска-3,75%, навага-3,4%, минтай-3,0% (Позднякова, 2001), за исключением пресноводных байкальских рыб: а именно широколобки, у которой содержание ДНК сопоставима с содержанием ДНК в молоках кеты и горбуши, а содержание ДНК молоках омуля и окуня сопоставимо с содержанием ДНК в молоках трески, наваги и минтая.

Из общего химического состава гонад пресноводных рыб (таблица 2) видно, что они являются потенциальными поставщиками ценных белков, из них наибольшее содержание белка наблюдается в молоках тайменя (24,3%) и омуля (16,5%), а в молоках окуня, широколобки и хариуса содержание белка приблизительно одинаково (13%– 15%).

Таблица 2 - Химический состав молок пресноводных рыб

Вид рыб	Содержание, в %					
	Влага	Белок	Зола	ДНК	РНК	Не идент. в-ва
Омуль*	74,8±1,5	16,5±0,9*	2,7±0,2*	3,75±0,26	0,67±0,03	1,6
Окунь	77,3±1,4	13,7±0,8	2,0±0,2	3,73±0,18	0,85±0,04	2,4
Широколобка	76,8±1,7	14,3±0,8	-	6,27± 0,56	1,65±0,09	1,0
Таймень	68,1±1,2	24,3±0,9	2,5±0,2	2,09±0,16	1,18±0,12	1,8
Хариус	80,3±1,4	14,8±0,9	1,9±0,1	1,82±0,09	0,20±0,01	0,9

В настоящее время предполагают, что нуклеопротеиды молок лососевых рыб обладают наиболее эффективным фармакологическим действием, так как их основным белком является протамин. Только в молоках лососей и сельдей обнаружены белки специфического состава – протамины, в то время как у большинства других видов (в частности тресковых) в молоках содержатся гистоны (Беседнова, 1999).

Эти два основных белка можно различить с помощью реакции Миллона: гистоны дают положительную реакцию Миллона, протамины отрицательную. По результатам проведенной качественной реакции на тирозин, мы определили, что основным белком составляющим комплекс с ДНК в молоках омуля, язя, налима является гистон, а в молоках широколобки и окуня – протамин. Это позволяет сделать предварительный вывод о наличии фармакологических свойств у группы «ДНК – протамин», а именно у молок широколобки и окуня.

Исследование активности дезоксирибонуклеаз в гонадах пресноводных рыб

В условиях проведения гидролиза во всех исследуемых сырьевых источниках отметили более высокую активность кислых дезоксирибонуклеаз, которые могут играть определенную роль в деградации ДНК на первых стадиях гидролиза, когда рН гомогенизированной ткани находится в слабокислой или нейтральной области. Наиболее высокую активность кислых нуклеаз отметили в молоках широколобки, омуля, окуня и леща, низкую – в молоках ленка.

Таблица 3 - Активность дезоксирибонуклеаз в молоках пресноводных рыб

Виды рыб	Активность дезоксирибонуклеаз, Е/г	
	Щелочные	Кислые
Широколобка	170,5±5,1	1471,9±34,0
Омуль	191,7±6,7	1717,7±58,7
Окунь	185,0±5,6	1165,5±27,9
Таймень	60,8±2,9	320,0±7,8
Елец	Следы*	406,0±8,6
Карась	83,3±3,6	738,4±10,1
Язь	429,0±8,1	941,1±15,8
Плотва	144,6±5,9	633,9±9,9
Налим	150,0± 6,3	511,1±9,7
Ленок	Следы*	300,0±7,6
Лещ	135,4 ± 5,5	1118,3±18,3

При исследовании активности Са, Mg-зависимых щелочных дезоксирибонуклеаз отметили наиболее высокую активность в молоках язя (429,0 Е/г), омуля (191,7 Е/г), широколобки (170,5 Е/г) и окуня (185,0 Е/г). Активность щелочной нуклеазы при данных условиях не проявлялась у ельца и ленка.

Из рисунка 1 видно, что активность щелочных нуклеаз на порядок ниже, чем кислых, такая разница в активности, по-видимому, связана с физиологическими особенностями объектов исследования.

При сопоставлении активности щелочных ДНК-аз (таблица 3) и содержания ДНК (таблица 1) в гонадах видна взаимосвязь между этими показателями. За некоторыми исключениями (язь) в объектах с высокой активностью ДНК-аз наблюдалось наименьшее содержание ДНК.

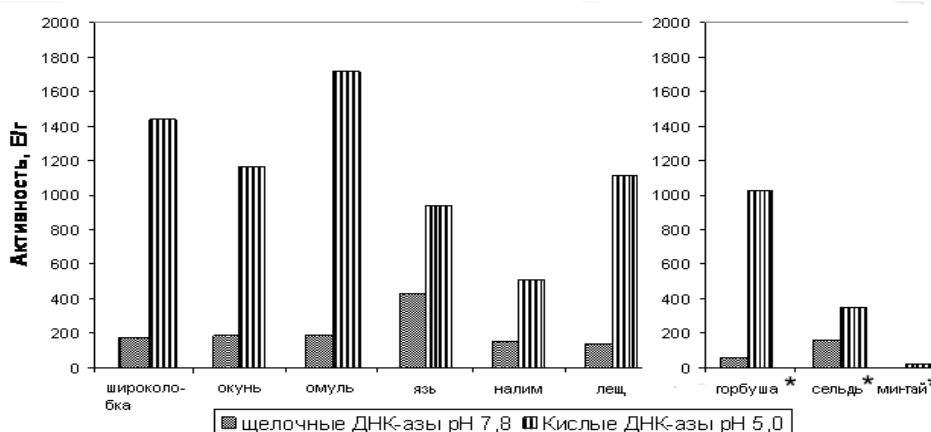


Рисунок 1 - Сравнительная активность дезоксирибонуклеаз в молоках пресноводных и морских* видов рыб.

Сравнительный анализ активности данных ферментов в молоках пресноводных и морских видов рыб (рисунок 1) показал, что нуклеолитическая активность в молоках

пресноводных рыб в среднем в 1,2 - 2 раза выше, чем в морских объектах. Что позволило ожидать более глубокий процесс деструкции ДНК при ее выделении.

Исследование активности протеолитических ферментов в гонадах пресноводных рыб

Из анализа результатов исследования активности протеолитических ферментов (таблица 4) установлено, что активность щелочных протеаз на порядок выше, чем кислых протеаз. Наиболее высокая казеинолитическая активность отмечена в молоках омуля (9,045 Е/г), тайменя (9,727 Е/г), карася (7,982 Е/г) и леща (7,727 Е/г). В остальных молоках активность щелочных протеаз на порядок ниже, возможно, содержащиеся в них протеазы требовали других условий или отличались иной субстратной специфичностью. При исследовании активности кислых протеаз была выявлена наиболее высокая активность в молоках ленка (2,927 Е/г) и налима (1,173 Е/г) и не проявилась в молоках тайменя, карася и язя.

Таблица 4 - Активность протеолитических ферментов в молоках пресноводных рыб

Виды рыб	Активность протеаз, Е/г	
	Щелочные	Кислые
Широколобка	4,07±0,51	0,57±0,03
Омуль	9,05±0,36	0,41±0,02
Окунь	2,01±0,14	0,61±0,04
Таймень	9,73±0,42	Следы*
Елец	2,74±0,18	0,21±0,02
Карась	7,98±0,30	Следы*
Язь	2,46±0,12	Следы*
Плотва	4,48±0,31	0,99±0,06
Налим	3,60±0,40	1,17±0,05
Ленок	1,01±0,04	2,93±0,11
Лещ	7,73±0,29	0,42±0,02

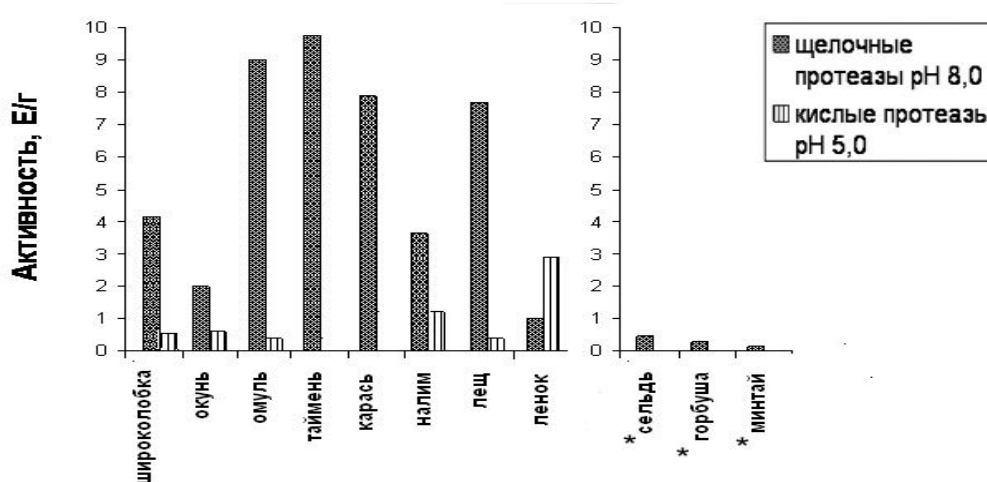


Рисунок 2 - Сравнительная активность протеаз в молоках пресноводных и морских* видов рыб.

В результате сравнительного анализа активности протеолитических ферментов в молоках морских и пресноводных видов рыб (рисунок 2) отмечена наибольшая активность в молоках пресноводных рыб, как в кислых, так и щелочных зонах pH.

Получение комплекса низкомолекулярной ДНК из молок пресноводных рыб и исследование их фракционного состава

При выделении ДНК из молок пресноводных рыб, растворы молок не устойчивы и быстро образуют гель-раствор, и поэтому для каждого вида подбирали необходимые условия pH, гомогенизации, температуры и длительности кипячения. Для выделения ДНК из молок широколобки, окуня и омуля требуется pH 8,0 - 8,5 среды (доводили 0,1 М NaOH), из молок тайменя, ельца и язя использовали pH 7,0 – 7,5. Кроме того, для молок омуля, окуня, язя и ленка требуется меньшее время выдерживания на водяной бане до 2 часов.

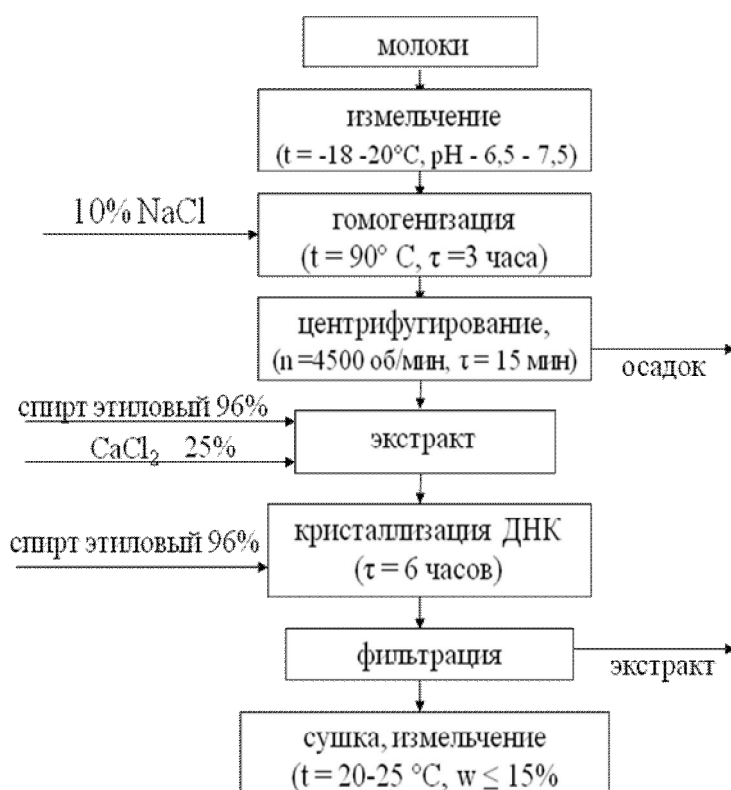


Рисунок 3 - Схема выделения комплекса низкомолекулярной ДНК из молок пресноводных рыб

Сухой порошок ДНК измельчали в ступке и взвешивали на аналитических весах с абсолютной погрешностью $\pm 0,0002$ г. Выход сухого комплекса ДНК из 5 г молок широколобки составил – 0,1 г.

Выделенная ДНК представляет собой аморфный порошок светло-кремового цвета, растворимый в воде при нагревании и не растворимый в органических растворителях. Содержание ДНК в препарате достигает 68 – 73 %.

Комплексы ДНК из молок пресноводных рыб, полученные указанным способом, исследовали на растворимость в зависимости от pH и температуры.

Показано, что при pH 6,5 и 7,0 даже через 15 и 20 мин соответственно суспензия ДНК в воде из молок окуня, омуля, тайменя остается без существенных изменений, и только при pH 8,0 – 8,5 достигается полная прозрачность, в то же время ДНК широколобки и налима при заданном диапазоне pH (5,5 – 9,0) растворяется в течение часа.

Таблица 5 – Содержание биополимеров в комплексах ДНК из молок пресноводных и морских рыб, %

ДНК	Нуклеиновые кислоты, %	Белок	Липиды	Вода
Пресноводные рыбы				
Комплекс ДНК омуля	69,0	11,4	-	15,1
Комплекс ДНК широколобки	72,5	8,5	-	16,3
Комплекс ДНК окуня	68,3	12,3	-	14,9
Морские рыбы*				
Препарат ДНК лососевых рыб*	79,02	7,8	2,1	10,7

Примечание: «-» - не определяли

Сравнительная характеристика комплексов ДНК с использованием высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ)

С целью идентификации выделенного комплекса ДНК использовали метод ВЭЖХ. Регистрацию пиков определяемых веществ осуществляли по времени удерживания и спектральным отношениям (220 и 260 нм) с соответствующими параметрами хроматограмм стандартных ДНК маркеров («ICN», США).

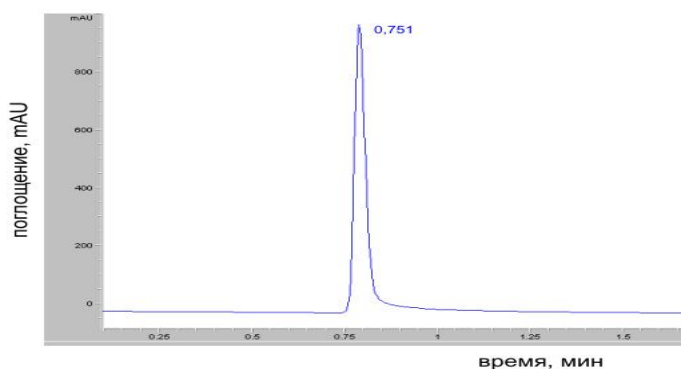


Рисунок 4 – Хроматография комплекса ДНК молок широколобки

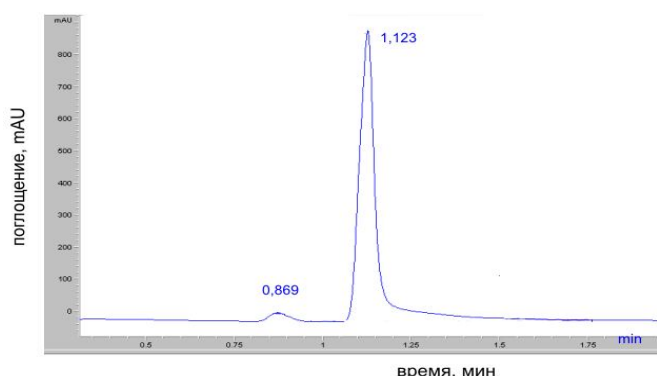


Рисунок 5 - Хроматография комплекса ДНК молок омуля

В результате проведения исследования были получены хроматографические профили комплексов ДНК молок пресноводных рыб и стандартных ДНК маркеров. Установлено совпадение пиков определяемых веществ с пиками стандартного набора ДНК, следовательно, исследуемые вещества являются компонентами нуклеиновых кислот. Показано, что в комплексах ДНК омуля, окуня и язя обнаружено по два фрагмента которые совпали с двумя пиками из стандартного набора ДНК (0,87 и 1,13), в комплексе ДНК широколобки и налима

отметили по одному пику которые совпали с пиком (0,751) стандарта ДНК, а в комплексе ДНК тайменя – три фрагмента, которые так же совпали по времени удерживания с тремя пиками стандарта ДНК (пики 0,85, 1,15 и 1,37).

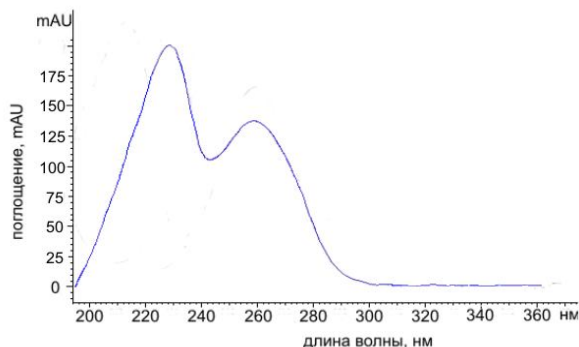


Рисунок 6 - УФ-спектр пика 1,123 комплекса ДНК омуля

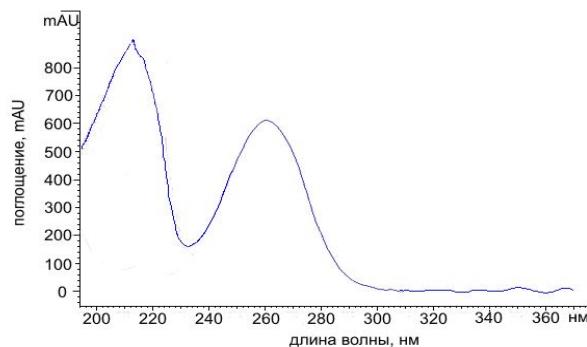


Рисунок 7 - УФ – спектр пика 0,751 комплекса ДНК широколобки

Расшифровку полученных пиков исследовали с помощью УФ-спектроскопии при длине волны 220 и 260 нм. Совпадение пиков при одних и тех же длинах волн свидетельствует о весьма близком количественном соотношении азотистых оснований в ДНК исследованных объектов, а различные величины пиков соответствуют установленной разнице в количественном содержании оснований ДНК в комплексах.

Фракционный состав низкомолекулярных нуклеиновых кислот из гонад различных видов гидробионтов

С целью определения молекулярной массы полученной ДНК из молок пресноводных рыб использовали метод гель-электрофореза. Молекулярную массу нуклеиновых кислот определяли по калибровочным графикам, построенным в координатах зависимости Rf от молекулярной массы по значениям, соответствующим наборам стандартных маркерных молекул рUC/Msp 1: 15,6, 20,4, 40,2, 66,0, 114,0, 145,0, 198,0, 242,4, 302,4 кДа.

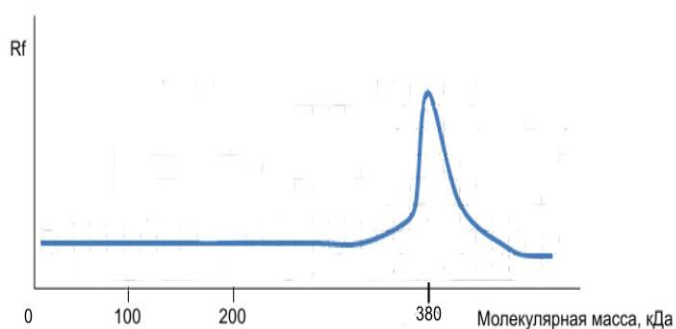


Рисунок 8 - Денситограмма комплекса ДНК из молок омуля

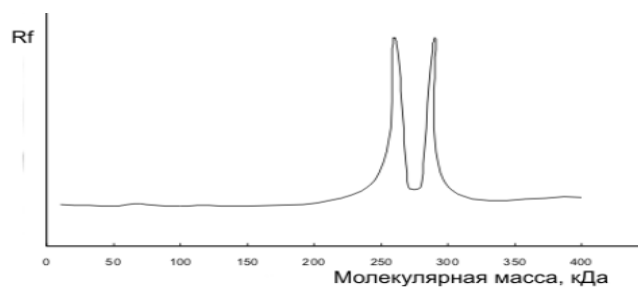


Рисунок 9 - Денситограмма комплекса ДНК из молок широколобки

Маркер рUC19 ДНК/MspI применяется для оценки длины небольших линейных двуцепочечных фрагментов ДНК в полиакриламидном геле. Представляет собой плазмиду рUC19 гидролизованную ферментом эндонуклеазой рестрикции Msp I, с образованием 9 фрагментов пригодных для использования в качестве стандарта молекулярных весов.

На рисунке 8 представлена полученная гель-хроматограмма, которая свидетельствует о присутствии в комплексе ДНК молок омуля одной фракции с молекулярной массой 380 кДа. В нуклеопротеидном комплексе широколобки обнаружено 2 пика с молекулярной массой 260 и 290 кДа (рисунок 9). Известно, что низкомолекулярная ДНК с молекулярным весом 270-500 кДа применяется в медицине и фармации.

МЕДИКО-БИОЛОГИЧЕСКИЕ ИСПЫТАНИЯ КОМПЛЕКСОВ ДНК ИЗ МОЛОК ПРЭСНОВОДНЫХ РЫБ

При проведении острой токсичности комплексов, полученных из гонад гидробионтов, гибели животных не наблюдалось.

Острую токсичность изучали по методике Першина Г.Н. Оценку проводили на белых мышах весом $20 \pm 1,0$ г, одного возраста, полученных из питомника одновременно и прошедших карантинный режим вивария, без внешних признаков заболеваний. Все животные содержались в одинаковых условиях, на обычном пищевом режиме. Исследуемые соединения вводили животным внутрибрюшинно в различных дозах, после чего регистрировали клиническую картину гибели и время гибели.

Токсичность экстракта нуклеопротеидных комплексов (НПК) ДНК полученных из молок пресноводных рыб Байкальского региона, представлена в таблице 6.

В результате исследований установили, что в соответствии с классификацией по Сидорову К.К. соединения I – IV относятся к третьему классу токсичности (умереннотоксичные), а соединение V - к четвёртому классу (малотоксичные).

Таблица 6 - Острая токсичность комплексов ДНК, выделенных из молок пресноводных видов рыб Байкальского региона

Гидролизаты	Острая токсичность, мг/кг	Класс токсичности по классификации Сидорова К.К.
I (НПК широколобки)	>3000	3
II (НПК тайменя)	>3000	3
III (НПК окуня)	>3000	3
IV (НПК омуля)	>3000	3
V (НПК налима)	>5100	4

Результаты опытов свидетельствуют о том, что острая токсичность (LD_{50}) комплексов широколобки, тайменя, окуня, омуля при пероральном введении превышает 3000 мг/кг.

При оценке безвредности комплекса ДНК с использованием *Tetrahymena pyriformis*, наблюдали наличие роста инфузорий, отсутствие деформации и угнетения подвижности. В результате чего сделали вывод о нетоксичности комплексов ДНК. Напротив, по приросту инфузорий отметили, что при добавлении в среду комплексов ДНК происходит оптимизация метаболических процессов инфузорий *Tetrahymena pyriformis*, что способствует лучшему усвоению питательных компонентов и ускорению их роста.

На основании результатов исследования показано, что как гидролизаты из молок, так и комплексы ДНК из молок пресноводных рыб являются безвредными для *Tetrahymena pyriformis*. Отмечен густой рост клеток инфузорий во всех пробах, допустимые изменения клеток *Tetrahymena pyriformis* дали гидролизаты из омуля и окуня. Гибели клеток от воздействия комплексов не выявлено.

Исследование анальгетической активности комплексов ДНК из молок пресноводных рыб

При проведении экспериментальных исследований на лабораторных мышах нами была обнаружена анальгетическая активность полинуклеотидов выделенных из молок пресноводных рыб Байкальского региона.

Анальгезирующее действие данных комплексов изучали на модели «уксусных корчей», химическим болевым раздражением мышей (таблица 7), которые вызывали однократным внутрибрюшинным введением (через рот) 1 мл 1% уксусной кислоты и подсчитывали корчи в течение 10 минут.

Исследуемые комплексы вводили внутрибрюшинно в дозе 40 мг/кг в виде водной суспензии стабилизированной твином-80, за час до инъекции альгогена (уксусной кислоты).

Таблица 7 - Анальгезирующее действие комплексов ДНК из молок пресноводных рыб при введении уксусной кислоты (количество корчей за 10 мин)

Комплекс ДНК	Доза, мг/кг	Среднее количество корчей после введения 0,75% уксусной кислоты, за 10 мин	Средний латентный период, мин
Широколобка	40	7,0±1,1	7,2
Таймень	40	16,6±2,2	6,2
Окунь	40	15,8±1,9	4,4
Омуль	40	13,6±1,4	4,0
Налим	40	18,2±2,3	3,4
Контроль	0	18,4±2,5	2,8

Анальгетический эффект оценивали по уменьшению количества уксусных корчей в процентах к контролю. Критерием эффективности при скрининге, является снижение болевой реакции не менее чем на 50% (Шварц, 2000).

По результатам эксперимента была определена высокая анальгетическая активность у комплексов ДНК, полученных из молок широколобки и омуля. Увеличение латентного периода от введения альгогена в случае применения ДНК широколобки составило 7,2 мин., у омуля 4,0 мин. в сравнении с контролем 2,8 мин. Среднее количество корчей после введения уксусной кислоты мышам составило у ДНК широколобки 7 корчей, у омуля 13,6 корчей, напротив контроля - 18,4 корчей.

Согласно критериям эффективности при скрининге препаратов БАВ, уменьшение болевой реакции должно быть не менее чем на 50%. По результатам эксперимента была определена высокая активность (более 50%) у комплекса ДНК, полученного из молок широколобки. Это показало целесообразность проведения дополнительных исследований анальгетической активности комплекса ДНК из молок широколобки для определения степени эффективности комплекса при его использовании в разных дозах (30, 40, 50 мг/кг).

Таблица 8 – Степень эффективности комплекса ДНК из молок широколобки при его использовании в разных дозах

№	Доза, мг/кг	Уменьшение корчей, %
1	30	63,06
2	40	61,96
3	50	78,37

Экспериментально изучено влияние различных дозировок комплекса ДНК на торможение укусных корчей у подопытных мышей. Установлено, что при увеличении дозы вводимого комплекса ДНК молок широколобки (таблица 8) уменьшается количество корчей, соответственно, степень анальгетической активности возрастает.

Наиболее высокий показатель торможения укусных корчей отмечен в дозе 50 мг/кг. Для достоверности анальгетической активности комплекс ДНК молок широколобки сравнили с анальгином (препарат из группы нестероидных противовоспалительных средств - метамизол натрия). Выбор эталона сравнения объясняется тем, что у аналогов по структуре (комплексов ДНК выделенных из молок рыб) нет данных по анальгетической активности, и ранее не проводилось.

При сравнении активности лекарственного препарата (анальгина) с комплексом ДНК из молок широколобки, выявлена большая анальгетическая активность у последнего (таблица 9). При проведении трех опытных серий зарегистрировано среднее торможение корчей у мышей на 78,4 %. Действие комплекса ДНК широколобки в 2 раза уменьшает количество укусных корчей по сравнению с анальгином и в 3,5 раза по сравнению с плацебо.

Таблица 9 - Сравнение анальгетической активности комплекса ДНК из молок широколобки с фармакологическим препаратом (анальгином)

Препарат	Доза, мг/кг	Количество корчей	Уменьшение
Метамизол-натрия	50	12,2±1,6	52,5
ДНК широколобки	50	6,7±0,6	78,4
Контроль	50	22,2±1,1	0

Из полученных результатов, как перспективный для дальнейших углублённых фармакологических исследований отобран один вид байкальских рыб – Широколобка (*Cottus*), семейство Cottidae – Керчаковые.

Полученные результаты исследований фармакологических свойств ДНК позволяют расширить спектр изучения и применения ДНК молок пресноводных рыб Байкальского региона.

ВЫВОДЫ

1. Исследован химический состав молок пресноводных рыб: определены содержания ДНК, белков и некоторых гидролитических ферментов в молоках 12 видов пресноводных рыб Байкальского региона.

2. Установлено, что содержание ДНК в молоках пресноводных рыб колеблется в широких пределах – от 0,96% (лещ) до 6,27% (широколобка). Перспективными биообъектами для получения комплексов ДНК являются молоки широколобки, омуля и окуня.

3. Содержание белка в молоках пресноводных рыб Байкальского региона больше, чем его содержание в молоках морских рыб. Показано, что гистоны являются главным по содержанию белком, составляющим комплекс с ДНК в молоках омуля, язя и налима, а протамины – в молоках широколобки и окуня.

4. В молоках пресноводных рыб имеются активные гидролазы – дезоксирибонуклеазы (ДНК-азы) и протеазы, которые имеют следующие существенные особенности – активность щелочных эндонуклеаз на порядок ниже, чем кислых, в то время как активность щелочных протеаз на порядок выше, чем кислых. Активность ДНК-аз в молоках пресноводных рыб несколько выше (в 1,2 раза), чем в молоках морских видов рыб и имеют наибольшую активность в кислой зоне рН.

Активность ДНК-аз и протеаз хорошо сохраняется при хранении, вызывая постепенный гидролиз биополимеров.

5. Получены комплексы ДНК из молок пресноводных рыб Байкальского региона, определены молекулярные массы фракций ДНК. Разработан проект технической документации по получению комплекса ДНК из молок пресноводных рыб (технический регламент № 1 от 15.11.2011).

6. Определена фармакологическая активность и острая токсичность препаратов. Установлено, что комплекс ДНК из молок широколобки обладает высокой анальгетической активностью и отличается малой токсичностью.

Список сокращений

БАВ – биологически активное вещество
БАД – биологически активная добавка
ВЭЖХ - высокоэффективная жидкостная хроматография
ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота
ДНК-аза - дезоксирибонуклеаза
ЛД – летальная доза
М.м. – молекулярная масса
НК – нуклеиновые кислоты
НН – нуклеоспермат натрия
НПК – нуклеопротеидный комплекс
РНК – рибонуклеиновая кислота

По материалам диссертации опубликованы следующие работы:

Статьи в журналах, рецензируемых ВАК:

1. **Захарова М.А.** Исследование нуклеиновых кислот в гонадах пресноводных рыб Байкальского региона / Гомбоева С.В., Цыренов В.Ж. // Вестник ВСГТУ. – Улан-Удэ. – 2010. - №2. – С. 38-45.

2. Позднякова Ю.М. Сравнительный анализ содержания ДНК и ферментного состава в гонадах рыб байкальского региона / Пивненко Т.Н., **Захарова М.А.**, Цыренов В.Ж., Гомбоева С.В., Давидович В.В. // Известия ТИНРО (Тихоокеанского научно-исследовательского рыбохозяйственного центра). – Владивосток. - 2011.- Т. 164. - С. 432-437.

Сборники научных трудов вузов, материалы конференций:

1. **Захарова М.А.** К проблеме рационального использования рыбного сырья / Гомбоева С.В., Дубинина О.Л., Цыренов В.Ж. // Приоритетные направления развития науки и технологий.- Книга II.– М.; Тула: Изд-во ТулГУ, 2006.- С. 42 – 44.

2. **Захарова М.А.** Содержание нуклеиновых производных в пресноводной рыбе // Молодые ученые Сибири. Материалы Всероссийской молодежной научно-технической конференции. – Улан-Удэ. - Изд-во ВСГТУ. – 2008. – С. 141-142.

3. **Захарова М.А.** Анализ содержания нуклеиновых производных в морских и пресноводных рыбах / Гомбоева С.В., Цыренов В.Ж. // Биология – наука 21 века. – 12-я Пущинская международная школа-конференция молодых ученых. Сборник тезисов. – 2008. – С. 206-207.

4. **Захарова М.А.** Получение биологически активных веществ из Байкальских рыб / Гомбоева С.В., Цыренов В.Ж. // Наука на рубеже тысячелетий. – Тамбов: Изд-во Першина Р.В. – 2008. – С. 361 – 363.

5. **Захарова М.А.** Содержание ДНК и активность нуклеаз в тканях рыб Байкальского региона / Гомбоева С.В., Цыренов В.Ж. // Конференция молодых ученых, общ-во биотехн. – Москва. – 2008. - С. 51-52.

6. **Захарова М.А.** О биологически активных веществах выделенных из рыб / Гомбоева С.В., Цыренов В.Ж. // Конференция молодых ученых ВСГТУ. – Улан-Удэ. – 2009. - С. 29-30.
7. **Захарова М.А.** Рыбное сырье как источник БАВ / Гомбоева С.В., Цыренов В.Ж. // Научно-практическая конференция «Высокие технологии 21 века». - ЦВК «Экспоцентр»: Москва. – 2009.
8. **Захарова М.А.** Определение биологической активности ДНК выделенной из молок пресноводных рыб / Гомбоева С.В., Цыренов В.Ж. // Междун. научно-практическая конфер. «Качество как условие повышения конкурентоспособности и путь к устойчивому развитию» - ВСГТУ: Улан-Удэ. – 2009. – С. 272-273.
9. Гольдштейн А.Г. Исследование фармакологической активности нуклеиновых кислот и их производных, полученных из гонад рыб байкальского региона / **Захарова М.А.**, Котегов В.П., Цыренов В.Ж. // Вестник Пермской государственной фармацевтической академии. - №6 – 2010. – С. 76-77.