

ЛЕВАГИНА Галина Михайловна

**БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ ПОДХОДЫ К РАЗРАБОТКЕ
ПРЕПАРАТОВ дсРНК КАК ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ
ПРОТИВОИНФЕКЦИОННЫХ СРЕДСТВ**

16.00.03 – ветеринарная микробиология, вирусология,
эпизоотология, микология с микотоксикологией
и иммунология

03.00.23 – биотехнология

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Работа выполнена в Федеральном Государственном учреждении науки
Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора,
ГНУ Институт экспериментальной ветеринарии Сибири и Дальнего Востока СО РАСХН РФ

Научный руководитель: доктор биологических наук, профессор
Масычева Валентина Ивановна

Научный консультант: доктор ветеринарных наук, старший
научный сотрудник
Прудников Степан Ильич

Официальные оппоненты: доктор ветеринарных наук, профессор
Димов Сергей Константинович

доктор биологических наук, старший
научный сотрудник
Белявская Валентина Александровна

Ведущая организация: **ФГОУ ВПО Новосибирский
государственный аграрный
университет**

Защита состоится « 2 » марта 2006 г. в 9 часов на заседании
диссертационного совета Д.006 045.01. в ГНУ Институт экспериментальной ветеринарии
Сибири и Дальнего Востока СО РАСХН РФ по адресу: 630501, Новосибирская обл.,
Новосибирский р-н, п. Краснообск, ГНУ ИЭВС и ДВ СО РАСХН

С диссертацией можно ознакомиться в ЦНСХБ СО РАСХН

Автореферат разослан « 27 » января 2006г.

Ученый секретарь

диссертационного совета

С.И. Логинов

1. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

1.1. Актуальность проблемы. Возрастающая потребность в профилактике и лечении инфекций человека и животных делает весьма актуальной разработку, изучение и производство видонеспецифичных средств защиты, обладающих широким спектром противoinфекционного и лечебно - профилактического действия.

Все большую значимость приобретают способы профилактики и экстренного лечения с помощью стимуляторов системы неспецифической резистентности. К которым относятся, интерфероны и индукторы интерферона синтетического и природного происхождения на основе двуспиральных полирибонуклеотидов, в том числе и дсРНК киллерных штаммов дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. Двуспиральные РНК стимулируют выработку эндогенного интерферона и являются перспективными средствами для профилактики и лечения инфекционных заболеваний.

Рядом авторов были показаны свойства препаратов, содержащих дсРНК, стимулировать интерферогенез и противoinфекционную устойчивость у человека и животных различных видов и классов (мыши, кролики, телята, рыбы, птицы). Выявлено выраженное противовирусное действие препарата дсРНК бактериофага f2 в отношении вируса болезни Ауэски, введенного с профилактической целью пороссятам, а дсРНК киллерных штаммов дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* способна стимулировать систему неспецифической устойчивости и образование интерферона у свиней. (Бояринцев Л.Е., 1992; Прудников С.И., 1996; Аликин Ю.С., 1996, 1998; Духовский А.А., 2001).

Учитывая остроту проблемы, связанной с ассоциативными инфекционными заболеваниями у свиней и пороссят, представляется перспективным продолжить поиск и исследования эффективных средств на основе дсРНК.

В последние годы разработан ряд технологических приемов получения композиционных препаратов различных биологически активных веществ (БАВ), позволяющих снизить содержание основного биологически активного вещества в составе лекарственного препарата, обеспечить пролонгированное действие, уменьшить токсическое действие БАВ, обеспечить сохранение структуры действующего начала. Одним из приемов получения эффективных препаратов является использование полимеров с биологически активными веществами. Для этих целей широко используются поливинилпирролидоны и полисахариды.

Исследователи неоднократно пытались повысить эффективность индукторов интерферона, продлить период повышенной активности системы неспецифической резистентности организма путем использования различных полимеров: ДЭАЭ-декстраном, альбумином, протамином, сефарозой, поли-L-лизинном совместно с интерферогенами (Соколова Т.М., 1991; Кольцов В.Д. 1993; Тазалухова Э.Б., 1993;). Однако эти работы не получили дальнейшего развития из-за незавершенности исследований по поиску высокопродуктивных экологически безопасных продуцентов дсРНК, разработки высокоэффективных технологий получения, позволяющих получать препарат в достаточно больших количествах.

Лимитирующими факторами для масштабного производства препаратов дсРНК *Saccharomyces cerevisiae* и их широкого использования являются: сложность технологии выделения, низкая продуктивность дсРНК биомассы дрожжей, высокая стоимость используемого сырья для культивирования дрожжей, высокая энергоёмкость, громоздкая система разрушения дрожжей.

Ранее предпринятые попытки повысить эффективность индукторов интерферона путем использования различных полимеров совместно с интерферогенами, в том числе и с дсРНК, показали перспективность подхода.

В доступной литературе не найдено данных по созданию различных модифицированных форм дсРНК *Saccharomyces cerevisiae* с перспективными полимерами поливинилпирролидоном (ПВП) и полиглюкином (ПГ). Это предопределило дальнейшие исследования. В качестве препарата сравнения использовали ридостин, содержащий дсРНК пекарских дрожжей (Рег. удостоверение 95/03/06)

1.2. Цель исследования: Оптимизация технологии получения дсРНК *Saccharomyces cerevisiae* и разработка новых композиционных препаратов с улучшенными свойствами на основе дсРНК и полимеров.

1.3. Задачи исследования:

- усовершенствовать состав среды для культивирования дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* киллерных штаммов в промышленных масштабах;
- изучить возможность использования газодинамического метода дезинтеграции для разрушения клеток дрожжей;
- разработать составы новых лекарственных препаратов, содержащих дсРНК и полимеры, как средств борьбы с инфекционными заболеваниями;
- оценить влияние полимеров на физико-химические и биологические свойства действующего начала дсРНК в препаратах;
- оценить профилактическую и терапевтическую эффективность вновь разработанных препаратов при инфекционных болезнях поросят.

1.4. Научная новизна.

Экспериментально доказана возможность замены источника аминокислотного азота - пептона и углеводного питания - мелассы на автолизат пекарских дрожжей и сахар для производства биомассы киллерных дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* в производственном масштабе. Применение разработанного нового состава среды позволило повысить содержание дсРНК в 1 кг более, чем в 3 раза.

Впервые экспериментально продемонстрирована эффективность использования модифицированной газодинамической вихревой мельницы для дезинтеграции микроорганизмов дрожжей в жидком потоке, что выразилось в увеличении выхода целевого продукта на 20-30 % и уменьшении энергозатрат в 2 раза.

Впервые экспериментально показана возможность использования приемов физической иммобилизации дсРНК дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* с полисахаридами (ПГ) и с синтетическими полимерами (ПВП).

Разработан состав и технология получения препаратов дсРНК-ПГ и дсРНК-ПВП. Содержание дсРНК - 2,4% , ПВП - 30% являются оптимальными для композиции дсРНК-ПВП. Для препарата дсРНК-ПГ оптимально содержание дсРНК - 4,2%, ПГ - 70%.

В исследованиях установлено влияние поливинилпирролидона и полиглюкина на физико-химические, структурные свойства дсРНК:

- повышается устойчивость дсРНК композиционных препаратов с полиглюкином и поливинилпирролидоном к действию нуклеаз крови человека на 10-30 %;

- использованные полимеры повышают уровень растворимости дсРНК препарата, причем скорость растворения препарата зависит от вида полимера;

- не изменяется первичная, вторичная и конформационная структура двойной спирали дсРНК при получении композиционных препаратов дсРНК с полимерами ПВП и ПГ

Выявлено, что комплексы дсРНК-ПВП и дсРНК-ПГ обладают различными уровнями биологических эффектов:

- комплекс дсРНК-ПВП приводит к пролонгации активности перитонеальных макрофагов мышей до 5 суток, стимулирует синтез интерферона до 2 суток, при меньшем в 3-4 раза содержании дсРНК, чем в выбранном для сравнения референс препарате – ридостин.

- комплекс дсРНК с полиглюкином при меньшем в 2 раза содержании дсРНК, чем в ридостине, имеет сопоставимые показатели по фагоцитозстимулирующей и интерферониндуцирующей активности.

Новые препараты на основе дсРНК обладают выраженными профилактическими свойствами при инфекционных болезнях поросят.

Комплекс дсРНК-ПВП способствует повышению терапевтической и лечебно-профилактической эффективности антибактериальных препаратов.

Получены два патента на изобретения: Патент № 2172631 «Индукторы интерферона пролонгированного действия»; Патент № 2215781 «Питательная среда для культивирования киллерных дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*»; Положительное решение о выдаче патента на изобретение «Способ лечения и профилактики желудочно-кишечных инфекционных болезней поросят в условиях промышленного свиноводства» по заявке № 2004111 060/14 (011839) от 30 03 2004.

1.5. Практическая значимость работы

1. Разработанный состав среды позволил усовершенствовать технологию производства биомассы киллерных дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* и был внедрен в производство в ООО «Диафарм» (г. Бердск Новосибирской области).

2. Разработанный способ дезинтеграции дрожжей внедрен в промышленное производство получения дсРНК из киллерных штаммов дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* в ООО «Диафарм» и позволил более полно извлекать целевую фракцию нуклеотидного материала при меньших энергозатратах.

3. Композиции дсРНК-ПВП и дсРНК-ПГ могут быть рекомендованы для создания на их основе новых форм индукторов дсРНК киллерных дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* для применения в ветеринарии, обладающих пролонгированным действием.

4. Разработан способ лечения и профилактики желудочно-кишечных болезней поросят в условиях промышленного свиноводства и рекомендован для использования в хозяйствах. Методические рекомендации «Применение иммуномодуляторов нуклеиновой природы в свиноводстве» утверждены Ученым советом ГНУ ИЭВСиДВ СО РАСХН (протокол № 1от 17 января 2006г.).

1.6. На защиту выносятся:

- Состав среды для культивирования дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* в промышленных масштабах.

- Способ разрушения дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* газодинамическим методом дезинтеграции в модернизированной вихревой мельнице.

- Состав новых препаратов дсРНК и различных полимеров, данные о физико-химических, структурных и биологических свойствах препаратов.

- Результаты профилактической и терапевтической эффективности новых форм индукторов интерферонов при инфекционных болезнях поросят.

1.7. Апробация работы

Основные положения, выводы и практические предложения, изложенные в диссертации, одобрены на межвузовском совещании ученых советов и ИМБ ГНЦ ВБ «Вектор» и ГНУ ИЭВСиДВ СО РАСХН 2 декабря 2005г.

Материалы были доложены:

IIIV Международная конференция и дискуссионный научный клуб Новые информационные технологии в медицине и экологии - Украина. Крым. Гурзуф.2000 - с. 105-106.

IX Международная конференция и дискуссионный научный клуб Новые информационные технологии в медицине и экологии - Украина. Крым. Ялта-Гурзуф.2001- с.173.

Российско-Канадский коллоквиум ISTC (МНТЦ) Canadian biological sciences colloquium. Moscow, 15-17 September 2004, p. 268-273.

1.8. Публикации результатов исследования.

По теме диссертации опубликовано 9 научных работ. Получено 2 патента на изобретения. Патент № 2172631 «Индукторы интерферона пролонгированного действия»; Патент № 2215781 «Питательная среда для культивирования киллерных дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*»; Положительное решение о выдаче патента на изобретение «Способ лечения и профилактики желудочно-кишечных инфекционных болезней поросят в условиях промышленного свиноводства» по заявке № 2004111 060/14(011839) от 30 03 2004(приложение)

1.9. Структура и объем работы

Диссертация изложена на 135 страницах и включает: введение, обзор литературы, собственные исследования, обсуждение результатов исследований, выводы, практические предложения, список литературы и приложения. Работа иллюстрирована 22 таблицами и 9 рисунками. Список литературы содержит 173 источника, из них 41 - зарубежных авторов.

2. СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Материалы и методы исследования. Работа выполнена в 1999-2005 гг. в ИМБ ФГУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, совместно с лабораторией болезни свиней ГНУ ИЭВСиДВ СО РАСХН, на свинокомплексе "Кудряшовский" Новосибирской области и ЗАО «Сибирская аграрная группа» Томской области.

Для выбора наиболее продуктивного штамма при культивировании биомассы использовали культуру *Saccharomyces cerevisiae* 10 киллерных штаммов, которые были получены из ВНИИ Гидролиза (г. Санкт-Петербург). Каждый штамм выращивали в стандартных условиях на средах, содержащих в качестве источников питания - пептон и мелассу, и проверяли содержание дсРНК в биомассе.

Для культивирования биомассы дрожжей в качестве источников питания использовали глюкозу, сахар, пептон, диаммоний фосфат, калий хлористый, сульфат аммония, автолизаты и гидролизаты дрожжей. Время роста культуры – 20 ч, при температуре – плюс 30° С и скорости вращения мешалки – 180-220 об/мин. Аэрацию осуществляли из расчета 1,5–2 объема воздуха на 1 объем питательной среды. Содержание глюкозы в питательной среде определяли по методу Бертраана-Шорля, а аминного азота по методу формального титрования киллерных дрожжей, разработанного в институте медицинской биотехнологии (ИМБ).

Дезинтеграцию биомассы микроорганизмов проводили в модернизированной вихревой мельнице, сконструированной ООО «Диафарм» и Институтом теплофизики СО РАН (г.Новосибирск) и изготовленную в ЗАО «Вихревые технологии-ВТ» (г.Новосибирск).

В помольную камеру мельницы подавали 4-5 кг суспензии биомассы. Воздух в рабочую камеру мельницы подавали в виде узкой тангенциальной струи под давлением от 0.05 до 0.6 МПа. Степень разрушения клеток оценивали визуально под микроскопом. Качественно наличие дсРНК определяли электрофорезом и характеризовали по молекулярной массе.

Количественный анализ белка, определение молекулярной массы, содержание ДНК, содержание нуклеотидного материала в %, удельную экстинкцию $E^{0.1\%}$, определение температуры плавления проводили по ФСП 42-0197076901.

Для получения композиций дсРНК с полимерами использовали препарат, содержащий 19-22 % дсРНК. В качестве полимерных носителей использовали ПВП с молекулярными массами 10000 и 35000 Да (ФС 42-2238-84) и полиглюкина (ФС42-876-74) с молекулярной массой 40000 Да.

Содержание дсРНК в комплексах определяли гель-хроматографией раствора препарата дсРНК на колонке с сепарозой CL2B ("Pharmacia", Швеция), регистрируя оптическую плотность элюата при длине волны 258 нм в высокополимерной фракции.

Оценку первичной структуры дсРНК в композициях проводили методом термической денатурации. Дифференциальные кривые плавления (ДКП) регистрировали на установке, созданной на базе спектрофотометрического УФ-детектора жидкостного хроматографа «Миллихром» в институте Биоорганической химии (г.Новосибирск). Каждая кривая плавления состояла из набора не менее чем 600 значений оптической плотности в зависимости от температуры с частотой 10 точек/°С. Регистрацию кривых термической денатурации проводили одновременно на длинах волн 260, 170, 280 и 300 нм. Время интегрирования сигнала на каждой длине волны не превышало 1,2 сек. Температуру в кювете контролировали медь-константовой термопарой с точностью ±0,05 °С. Концентрация препаратов дсРНК в образцах составляла 0,14г/мл; скорость нагрева образцов составляла 0,5-0,7 °С/мин.

Оценку пространственной структуры дсРНК в композициях проводили методом кругового дихроизма (КД). Спектры кругового дихроизма записывали на приборе JASCO 600 (Япония) в кювете с длиной оптического пути 1см. Степень разрешения спектров- 0,2 нм/точку, диапазон измерения от 200 до 350нм (диапазон измерения кругового дихроизма для нуклеиновых кислот). Спектры представлены в размерности mdeg (милиградус поворота поляризованного света). Концентрация препаратов дсРНК в образцах составляла 0,07мг/мл;

Определение характера связи молекул дсРНК с полимерами проводили методом ИК-спектроскопии на ИК-Фурье спектрометре "Vector-22" фирмы "Bucker" (ФРГ) в НИОХ СО РАН. Для этого 1-1,5 мг препарата дсРНК растирали со 150 мг КВг и из этой смеси формировали таблетку, ИК-спектры снимали в диапазоне длин волн 400-4000 см⁻¹. Полученные спектры сравнивали со спектрами исходных компонентов.

Исследование устойчивости дсРНК композиций к действию нуклеаз проводили, инкубируя растворы препаратов дсРНК при 37 °С с нуклеазами. Отбирали пробы по 0,5 мл и добавляли к ним равный объем 4% хлорной кислоты. Чувствительность препаратов к нуклеазам определяли по накоплению низкомолекулярных продуктов гидролиза в кислоторастворимой фракции.

Определение показателей растворимости препаратов проводили в соответствии с требованием Гос. Фармакопеи ГФХІ, вып.І.

Определение фагоцитозстимулирующей активности (ФСА) проводили на монослойной культуре клеток L-929 по методу Rowley. Процент стимуляции макрофагов определяли как отношение показателей, установленных для опытных групп животных, к контрольным значениям по формуле: $(\Phi A_{\text{опыт}} / \Phi A_{\text{контроль}}) \times 100\%$ и фагоцитарный индекс считали по количеству поглощенных эритроцитов на один фагоцитирующий макрофаг. Достоверность различий оценивали по критерию Стьюдента. Доза вводимых препаратов равнялась 5мг/кг и была эквивалентной при проведенных ранее исследованиях препаратов дсРНК- ридостина.

Средне - смертельные дозы определяли экспресс-методом по Прозоровскому при внутрибрюшинном введении препаратов беспородным половозрелым мышам массой 18-22г. Препараты дсРНК растворяли в физиологическом растворе и вводили из расчета 0,2 мл на 20 г массы тела.

Метод изучения профилактической активности препаратов у поросят в производственных условиях. Работа выполнялась в течение 2000-2004 г.г. совместно с лабораторией по изучению болезней свиней ГНУ ИЭВС и ДВ СО РАСХН, в ОАО «Кудряшовское» Новосибирской области и ЗАО «Сибирская аграрная группа» Томской области.

Объектом исследования служили поросята породы крупная белая 10-106-дневного возраста. При изучении лечебно-профилактической эффективности исследуемых препаратов в опытах было использовано более 3000 поросят.

При постановке всех экспериментов животные находились в одинаковых условиях кормления и содержания.

Изучение профилактической эффективности применения препаратов дсРНК-ПВП и дсРНК-ПП при инфекционных болезнях поросят отъемышей проводили в условиях интенсивного промышленного выращивания свиней

В первой серии опытов определяли эффективность применения изучаемых препаратов для профилактики инфекционных болезней поросят-отъемышей (отёчная болезнь, сальмонеллёз и др.) в производственных условиях.

Во второй серии опытов изучали эффективность лечения поросят при инфекционных болезнях с одновременным использованием индукторов интерферона и антибиотиков. Предварительно у поросят-отъемышей участка доразведения определяли микробный и вирусный фон.

Эффективность различных схем профилактики оценивали по приросту живой массы и уровню сохранности поросят.

Цифровой материал был обработан на ПЭВМ с использованием стандартных программ и критерия Стьюдента.

3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

3.1. Выбор перспективных штаммов киллерных дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* и среды для культивирования дрожжей при промышленном производстве дсРНК

Для выбора перспективных штаммов проведен скрининг 10 киллерных штаммов дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*.

Установлено, что 3 штамма (5БК674, У-448, 6АБ) имеют наибольшую продуктивность по выходу биомассы и по содержанию дсРНК в ней. Из 3 штаммов наибольшую продуктивность по дсРНК (до 150 мг/кг биомассы) при выращивании в стандартных условиях имел штамм 5БК 674 .

Для культивирования штаммов 5 БК 674 и У-448 подбирали питательную среду для получения максимального содержания дсРНК (мг/в 1 кг биомассы).

В дальнейшей работе использовали штаммы 5БК 674 и У-448. Выращивание биомассы в заводских условиях проводили в ферментерах со стандартной регламентной средой (с пептоном и мелассой) $V=4м^3$.

Культивирование штаммов в заводских условиях на регламентной среде (пептон и меласса) показало, что штаммам 5БК674 (выход 80кг биомассы)

более чем в 1,6 раза продуктивнее штамма Y-448(50кг) по выходу биомассы, и в 2- 3 раза - по содержанию дсРНК в 1 кг биомассы. Штамм 5БК674 накапливал 163мг дсРНК в 1 кг дрожжей, а штамм Y-448 – 48- 80 мг дсРНК в 1 кг дрожжей

Далее для наиболее продуктивных по дсРНК штаммов 5 БК 674 и Y-448 подбирали питательную среду для получения максимального содержания мг дсРНК в 1 кг биомассы.

Известно, что для выращивания киллерных дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, полученных генетически путем скрещивания ауксотрофных и прототрофных штаммов дрожжей, необходимо присутствие органического источника азотного питания (Г.Ф. Нестерова, 1991г). В микробиологической промышленности для приготовления таких питательных сред широко используются гидролизаты и автолизаты биомасс различных микроорганизмов.

Для исследований готовили автолизаты и гидролизаты пекарских, кормовых дрожжей и отходов биомассы киллерных дрожжей (после извлечения из нее дсРНК). Гидролизаты дрожжей готовили из расчета содержания аминного азота не менее 150 –180 мг % единиц на мл питательной среды.

Выращивание биомассы на среде, полученной из отходов биомассы, показало, что содержание дсРНК в биомассе, выше (90-100мг/кг биомассы), чем на среде с пептоном (48-60 мг/кг биомассы).

Эксперименты по влиянию источников азотного питания на содержание дсРНК в биомассе при масштабировании процесса культивирования штаммов 5 БК 674 и Y-448 показали, что использование питательной среды, содержащей автолизаты и гидролизаты пекарских дрожжей, являются оптимальными для промышленного культивирования в сравнении с ранее используемой среды с пептоном (табл.1).

Таблица 1 - Влияние источника азотного питания на выход дсРНК при масштабировании в рабочем объеме $V = 4 \text{ м}^3$

Состав среды	Шифр штамма	Выход биомассы, кг	Выход дсРНК, мг/кг биомассы
Регламентная среда: Пепгон Меласса	Y-448	39-43	56-86
	5БК674	80	163
Среда с гидролизатом пекарских дрожжей Меласса	Y-448	27-32	63-120
	5БК674	25-44	100-186
Среда с автолизатом пекарских дрожжей Меласса	Y-448	20-28	90-280

Из данных табл.1 видно, что продуктивность штамма Y-448 на среде с гидролизатом сопоставима с таковой, полученной на среде, содержащей пептон, и составляет 63-120 мг дсРНК/кг биомассы. Выход дсРНК при выращивании дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* на среде с автолизатом выше в 1,4-2,3 раза и составляет 90-280 мг дсРНК/кг биомассы. Продуктивность штамма 5БК674 выше продуктивности штамма Y-448 на всех средах в 1,55 –1,9 раза.

Источником углеродного питания в технологии служит меласса - отход свеклосахарного производства. Содержащиеся в мелассе меланоидины и карамели, как известно, являются ингибиторами роста дрожжей. Иногда в результате сахароаминной реакции, сахар в мелассе полностью исчезает, что делает ее абсолютно непригодной для культивирования микроорганизмов.

Это объясняет необходимость поиска стандартизуемого источника углеводного питания для промышленного культивирования биомассы киллерных дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*

Использование сахара известно для выращивания хлебопекарских дрожжей в различных сочетаниях с мелассой и без нее.

Эксперименты по подбору состава углеводного питания среды для культивирования биомассы дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* штамма Y-448 проводились в ферментерах с рабочим объемом питательной среды $V=1,8\text{м}^3$ (табл.2).

Таблица 2 - Влияние состава источника углеводного питания среды на выход биомассы и дсРНК

Состав источника углеводного питания	Выход биомассы, кг	Выход дсРНК, мг/кг
Среда: автолизат пекарских дрожжей Сахар : меласса- 50% : 50%	15-19	253-388
Среда: автолизат пекарских дрожжей Сахар : меласса- 70% : 30 %	17,6	452
Среда: автолизат пекарских дрожжей Сахар - 100 % сахар	14	413
Среда: автолизат пекарских дрожжей Меласса	16-19	90-150

Видно, что при использовании среды с содержанием мелассы в питательной среде, в количестве равно и меньше, чем 50 %, содержание дсРНК в биомассе увеличивается более, чем в 3-5 раза раз при сравнительно одинаковом выходе биомассы.

Экономическая эффективность замены пептона на автолизат пекарских дрожжей и мелассы на сахар составила 600-1500 руб. на 1 кг. биомассы при выращивании биомассы киллерных дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* в промышленных масштабах.

3.2. Результаты использования газодинамического метода для дезинтеграции дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*

Разрушение клеток биомассы, осуществляют, как правило, в жидкой среде. Для этих целей наиболее распространены роторные, баллистические дезинтеграторы и центробежно-барботажные аппараты, в которых прерывание потока жидкости происходит при проходе через узкие канюли между ротором и статором и при обтекании мелющих тел.

Недостатками таких устройств являются сильные локальные разогревы при кавитации в местах контакта мелющих тел, приводящие к потере нативных свойств внутриклеточных структур. Для устранения влияния разогревов на

выход конечного продукта требуется управление тепловыми потоками жидкой среды.

При изучении пригодности использования газодинамического метода для дезинтеграции микроорганизмов привлекает простота конструкции газодинамического измельчителя твердых тел - вихревой мельницы, в которой отсутствуют локальные разогревы при разрушении материалов и возможность ее модификации под центробежно-барботажные аппараты разрушения микроорганизмов.

Использование вихревой мельницы для дезинтеграции микроорганизмов неизвестно.

В работе модифицировали вихревую мельницу с диаметром помольной камеры 150 мм. На боковой поверхности помольной камеры выполнили 4 ступени, расположенные последовательно через 90° друг от друга, при угле наклона ступеней - 5° . Расход подаваемого воздуха составил $150 \text{ м}^3 / \text{ч}$. при избыточном давлении от 0.1 до 0.6 МПа. Суспензия клеток в камеру поступала самотеком.

При анализе степени разрушения клеток под микроскопом обнаружено повреждение от 60% клеток при однократном проходе суспензии клеток через камеру мельницы и при двукратном - до 90 % клеток. По-видимому, большую ответственность за разрушение клеток несет импактное взаимодействие дисперсных частиц несущей жидкости со стенкой вихревой камеры.

Ниже приведены данные сравнения результатов дезинтеграции дрожжей в вихревой мельнице на оптимальном режиме при 0,1 МПа в сравнении с разрушением в баллистическом дезинтеграторе ФУГ-1, используемом ранее в технологии выделения дсРНК (табл.3) при одно- и двукратном проходе дезинтегрируемой биомассы через помольную камеру. Из приведенных данных следует, что при двукратном проходе суспензии клеток через камеру увеличивается выход суммарной фракции нуклеотидного материала в 1,25 раза и дсРНК в 2,2 раза, в сравнении с дезинтеграцией дрожжей в ФУГ-1.

Преимущество газодинамического метода разрушения дрожжей в вихревой мельнице проявилось в уменьшении удельных затрат энергии в 2 раза и увеличении производительности в 4 раза.

Таблица 3 - Сравнительные данные по разрушению дрожжей в вихревой мельнице и дезинтеграторе ФУГ- 1

Дезинтегратор	Вихревая мельница		ФУГ-1
	1 проход	2 прохода	
Производительность, кг/ч	4-5	2-4	1
Содержание нуклеотидного материала, %.	78,11	85,5	60,5
Содержание дсРНК, %	26	60	27
Удельные затраты энергии, кВт·ч/кг	1-1,5	2	2,5
Охлаждение	Не требуется	Не требуется	Водяное

Итак, проведенные модификации вихревой мельницы позволили впервые использовать ее по новому назначению - для дезинтеграции микроорганизмов в

жидкой среде. В данной работе удалось разработать эффективные условия дезинтеграции биомассы дрожжей в жидкой среде и выбрать режимные параметры для максимального сохранения нативных свойств дсРНК.

Успешное решение задач поиска продуктивных штаммов киллерных дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, разработки сред для промышленного культивирования дрожжей и нового высокопроизводительного способа дезинтеграции дрожжей создает базу для рентабельного масштабного производства высокоэффективного противовирусного препарата на основе дсРНК, а также открывает новый этап для широких исследований и разработки новых лекарственных препаратов индуктора интерферона.

3.3. Данные о влиянии полимеров на физико-химические и биологические свойства дсРНК

В работе проведены исследования получения более эффективных препаратов индукторов интерферона дсРНК *Saccharomyces cerevisiae* с водорастворимыми полимерами природного и синтетического происхождения - ПГ и ПВП.

Получение композиций дсРНК с полимерами проводили методом физической иммобилизации. Для получения комплексных препаратов использовали ПВП молекулярной массы 10 000 и 35 000Да и ПГ - 40 000Да.

Для исследования получили препараты дсРНК-ПВП с содержанием: дсРНК 0,3; 2,4;5,0 и 9,3%; ПВП молекулярной массы 10 000 и 35 000Да - 10, 20, и 30%.

Препараты дсРНК-ПГ содержали дсРНК в количестве 0,66; 1,2; 2,4; 4,2%; полимера ПГ - 20, 30, 70%.

Для выяснения влияния полимеров на физико-химические свойства дсРНК полученные нами препараты были охарактеризованы с помощью физико-химических методов УФ-, ИК- и КД-спектроскопии, гель-электрофорезом и др.

3.3.1. Определение характера связи молекул дсРНК с полимерами

В ИК-спектрах сложных молекул и их смесей наблюдают полосы, складывающиеся из валентных колебаний С-N или С=O и других групп. По изменению максимума поглощения каждой группы, меняющейся в той или иной степени в зависимости от конформации и типов возникающих связей, судят о взаимодействиях между веществами.

Об образовании валентных взаимодействий в композициях судили по разности, определенной при вычитании из величин спектра дсРНК величин спектра ПВП (ПГ). Установлено, что ИК-спектр композиции дсРНК-ПВП не является простым сложением величин спектров дсРНК и ПВП (рис.1). Разность величин спектров между дсРНК и ПВП и исчезновение величин поглощения в спектре разности полос (наиболее интенсивных для поглощения азотистых оснований) на уровне 859 см^{-1} , 950 см^{-1} и 1074 см^{-1} говорит об образовании валентных связей между дсРНК и ПВП.

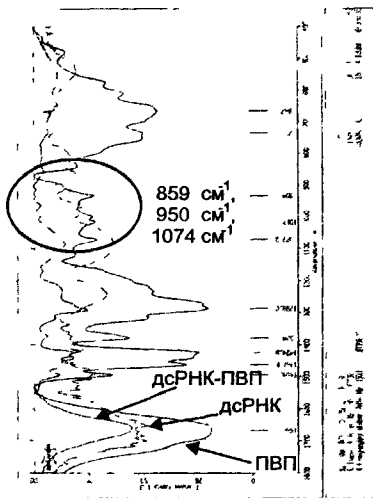


Рисунок 1 ИК-спектр дсРНК, поливинилпирролидона и композиции дсРНК-ПВП

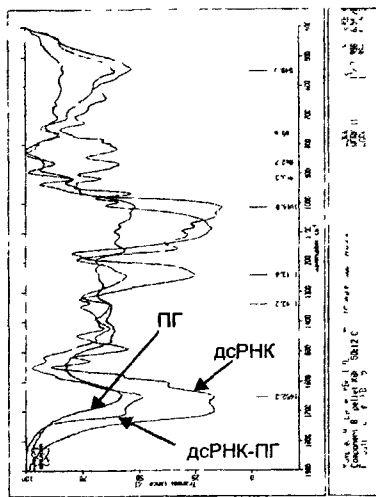


Рисунок 2. ИК-спектр дсРНК, полиглуткина и композиции дсРНК-ПГ

Кроме того, сопоставление спектров до 4000 см^{-1} показало, что при вычитании из спектра препарата дсРНК-ПВП значений спектра дсРНК, полученное значение не совпадало с ИК-спектром ПВП в области валентных колебаний карбонильной группы ($\text{C}=\text{O}$) ($1750\text{-}1658\text{ см}^{-1}$) ПВП. Дополнительно, в области валентных колебаний ПВП в ИК-спектрах образование комплекса характеризовали по уменьшению, или исчезновению, полосы внутримолекулярной водородной связи ПВП при 2930 см^{-1} и смещению полосы межмолекулярной водородной связи полимера из области 3430 см^{-1} к 3390 см^{-1} , что дополнительно подтверждает образование межмолекулярной связи между дсРНК и ПВП.

В то же время, ИК-спектр препарата дсРНК-ПГ (рис.2) представляет собой сумму ИК-спектров обоих компонентов, из чего можно сделать вывод, что валентных взаимодействий между ними не происходит

Данные ИК-спектров препаратов дсРНК-ПГ и дсРНК-ПВП после двух лет хранения при температуре $4\text{-}8^{\circ}\text{C}$ и $16\text{-}25^{\circ}\text{C}$ показали, что максимумы поглощения остались на том же уровне и с той же интенсивностью поглощения.

3.3.2. Данные о пространственной структуре дсРНК в композиционных препаратах. Сопоставление профилей КД спектров субстанции дсРНК с ее композициями показали, что они имеют профиль, характерный для рибонуклеиновых кислот, и практически совпадают с профилем КД спектра субстанции дсРНК. Это выражено в существенном превосходстве величины положительного сигнала КД вблизи 260 нм над интенсивностью отрицательного сигнала в области $230\text{-}240\text{ нм}$. На основании этого сделан вывод, что изменения пространственной структуры дсРНК в присутствии ПВП или ПГ не происходит.

Это также свидетельствует об отсутствии прочных взаимодействий между дсРНК и полимером, так как появление прочных межмолекулярных связей (ковалентной), как правило, вызывает перестройку пространственной структуры взаимодействующих компонентов. По отсутствию существенных перестроек структуры дсРНК в комплексных препаратах можно прогнозировать сохранение специфической активности новых препаратов дсРНК.

3.3.3. Данные о растворимости препаратов

Определение растворимости препаратов проводили в соответствии с требованием Гос. фармакопейной статьей ГФХІ, вып. 1. Композиционные препараты дсРНК с полимерами содержали равное (по 3,64 мг) количество нуклеотидного материала каждый.

Установили, что препарат с поливинилпирролидоном растворяется медленнее (за 1 мин.), чем препарат с полиглюкином (за 2 мин.), но оба препарата с полимерами растворяются быстрее, чем субстанция препарата ридостин (5 мин.).

3.3.4. Данные об устойчивости дсРНК в композициях к действию нуклеаз

Изучение устойчивости композиций дсРНК с ПВП и ПГ к нуклеазам крови и эндонуклеазе *Ser. marcescens* проводили в зависимости от молекулярной массы ПВП и содержания полимеров в композициях. Чувствительность препаратов к нуклеазам определяли по накоплению низкомолекулярных продуктов гидролиза в кислоторастворимой фракции (КРФ).

На рис. 3 приведены кривые накопления КРФ препаратов дсРНК-ПВП в зависимости от содержания высокополимерного ПВП в препарате. Содержание ПВП м.М. 35000 Да в препаратах дсРНК-ПВП составляло 10 и 30%.

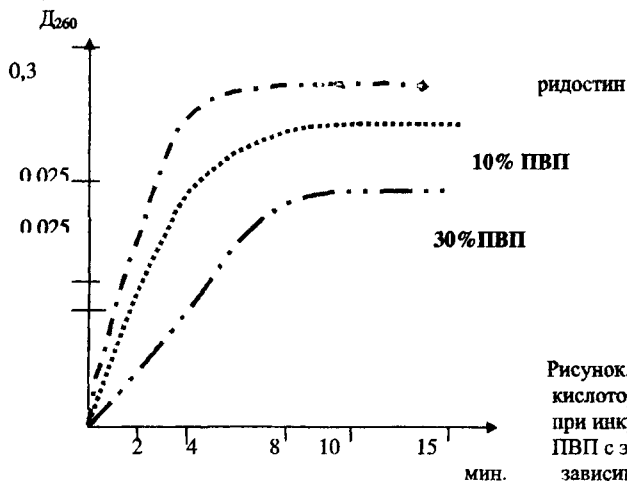


Рисунок.3 Кинетика накопления кислоторастворимой фракции при инкубировании препаратов дсРНК-ПВП с эндонуклеазой *Ser. marcescens* в зависимости от содержания поливинилпирролидона Мм35000 Да.

Исследование устойчивости дсРНК к действию нуклеазы в зависимости от содержания высокополимерного носителя ПВП в комплексном препарате указывает на то, что при большем содержании высокомолекулярного полимера

устойчивость дсРНК к действию нуклеазы повышается в сравнении с ридостином.

Такая же закономерность наблюдается и для препарата дсРНК-ПГ (природного полисахарида – полиглюкина) Содержание ПГ в препарате дсРНК-ПГ составляло - 20, 30 и 70%. Было показано что, чем выше содержание ПГ в препарате, тем выше, соответственно содержанию полиглюкина, устойчивость дсРНК.

На рис.4 представлены кривые накопления кислоторастворимой фракции дсРНК при инкубировании препаратов дсРНК-ПГ и дсРНК-ПВП с сывороткой крови человека.

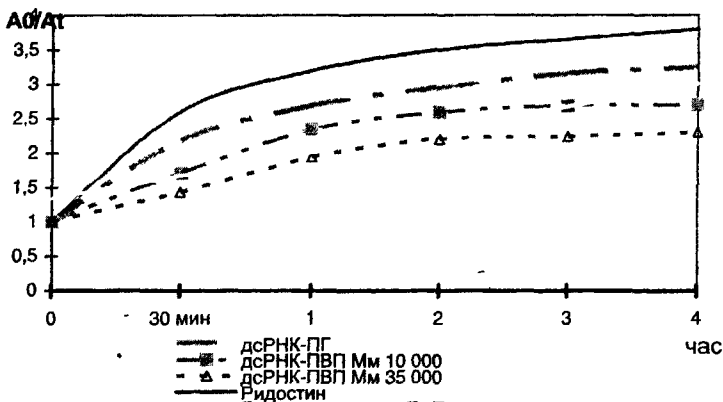


рис.4 Кинетика накопления кислоторастворимой фракции при инкубировании препарата дсРНК-ПГ с сывороткой крови человека. (по оси абсцисс - длительность инкубации, час. по оси ординат - отношение оптической плотности кислоторастворимой фракции при 260 нм к начальной оптической плотности)

Видно, что устойчивость дсРНК к нуклеазам крови человека в комплексном препарате дсРНК - ПВП выше, что выразалось в уменьшении содержания КРФ на 20-30 %, чем ридостина, и зависит от молекулярного веса полимера. Показано также, что содержание КРФ при инкубировании препарата дсРНК-ПГ ниже на 10-15%, в сравнении с ридостином. Содержание ПГ в препарате дсРНК-ПГ – 70%.

Таким образом, проведенные исследования позволили установить, что на устойчивость индуктора интерферона дсРНК к нуклеазам влияют природа полимера, его процентное содержание в препарате и молекулярный вес полимера.

3.3.5. Данные о первичной структуре дсРНК.

Определение параметров термической денатурации препаратов дсРНК проводили в Институте биоорганической химии СО РАН (г. Новосибирск).

Для оценки влияния полимеров на тонкие особенности первичной структуры дсРНК провели изучение препаратов методом термической денатурации высокого разрешения, позволяющим получать данные, отражающие характер распределения пар оснований аденин-урацил (АУ) и гуанин-цитозин(ГЦ) в молекулах природных двуспиральных нуклеотидов. Во

избежание влияния солей на термическую денатурацию плавление всех композиционных препаратов дсРНК проводили в условиях эксперимента с низкой ионной силой, предусмотренной для комплекса дсРНК-ПГ(0,041MNaCl).

Термические денатурации препаратов воспроизводимо дают близкие по степени разрешенности и идентичные по локализации температурных переходов профили дифференциальных кривых плавления (ДКП) дсРНК.

Типичный профиль ДКП композиционных препаратов дсРНК имеет два суперпозиционных максимума: низкотемпературный (40-50°C) и высокотемпературный (80-90°C). Низкотемпературный переход в диапазоне температур состоит из трех локальных переходов при температурах 45°, 47°, 49°C, обусловленных обогащенными АУ парами М формы дсРНК. Высокотемпературный переход имеет три отдельных четко выраженных максимума 78.5°, 80.5°, 84.5 °C и обусловлен АУ парами L формы дсРНК. В области 89°C выделяется переход отражающий температурную денатурацию незначительной фракции доменов с повышенным содержанием (ГЦ)-пар оснований.

Значения суперпозиционных максимумов первых производных кривых термической денатурации показали одинаковые величины температур плавления исследованных образцов препаратов дсРНК в сопоставлении с Na-солью дсРНК. ДсРНК имеет Tпл. - 87,5 °C, препарат дсРНК-ПВП - 86,5°C, дсРНК-ПГ - 86,5°C.

Итак, термические денатурации препаратов воспроизводимо дают, близкие по степени разрешенности и идентичные по локализации температурных переходов, профили ДКП дсРНК, что говорит об отсутствии изменений первичной структуры молекулы дсРНК композиционных препаратов

Таким образом, изменения, выявленные физико-химическими методами и методами ИК-спектроскопии, дают основание полагать, что композиционные препараты после выбора оптимальных концентраций дсРНК будут иметь другую динамику основных биологических свойств дсРНК и обладать иной эффективностью по сравнению с ридостином.

3.4. Выбор оптимального содержания дсРНК и природного полисахарида в композиционном препарате дсРНК-ПГ

Для выбора оптимального содержания дсРНК и природного полисахарида в композиционном препарате дсРНК-ПГ использовали показатели определения фагоцитозстимулирующей активности перитонеальных макрофагов мышей при введении препарата внутривентриально.

Метод определения фагоцитозстимулирующей активности (ФСА) прост и информативен и впервые предложен Масычевой В.И. с соавт. (1985) для первичной оценки природной дсРНК как индуктора интерферона.

Для выбора оптимального соотношения дсРНК и ПГ использовали результаты фагоцитарной активности перитонеальных макрофагов мышей, которым вводили исследуемые препараты. Исследование функциональной активности макрофагов проводили через 5, 24, 48 часов после введения (табл.4).

Как показали эксперименты, все исследованные препараты дсРНК-ПГ стимулировали фагоцитарную активность. Повышение функциональной

активности перитонеальных макрофагов мышей наблюдали уже через 5 часов после введения препаратов. Этот эффект сохранялся и через 24 часа.

Для изучения зависимости стимулирующего эффекта комплекса дсРНК-ПГ от содержания дсРНК в препарате было проведено исследование образцов препаратов с содержанием дсРНК в препарате 0,66; 1,2; 2,4 и 4,2 %.

Таблица 4 - Показатели фагоцитозстимулирующей активности препаратов дсРНК-ПГ с разным содержанием дсРНК при введении мышам (в/бр)

Препарат, дозы	Показатели фагоцитарной активности через:					
	5ч		24ч		48ч	
	ФА	% кК	ФА	% кК	ФА	% кК
Контроль	6,5	100	9,0±1,6	100	8,1±0,8	100
Полиглоктин, 0,66% дсРНК +полиглоктин	4,2±0,4	64,6	18,9±2,0*	210*	4,4±0,5	54,3
1,2 % дсРНК +полиглоктин	13,0±1,0*	200*	20,8±3,2*	231*	3,9±0,6	48,1
2,4 % дсРНК +полиглоктин	11,7±0,6*	180*	23,6±2,6*	262*	4,8±0,2	59,2
4,2 % дсРНК +полиглоктин	12,1±1,1*	186*	36,2±7,2*	402,2*	7,3±2,9	90,1
субстанция дсРНК, (18%)	13,5±0,7*	208*	41,5±3,4	461,1*	6,25±1,0	77,2
	12,4±2,4*	191*	49,2±6,5*	546,6*	7,1±1,2	87,6

* P < 0,05- различия с контролем (физиологический раствор) достоверны.

По приведенным в таблице данным, можно выделить две фазы ответа фагоцитов на введение дсРНК в свободной и композиционных формах. В ранние сроки (5 часов) все препараты в равной степени стимулировали фагоцитарную активность макрофагов, при этом эффект препаратов не зависел от содержания дсРНК. Через сутки после введения наблюдались изменения показателей фагоцитоза. ФСА композиций, содержащих низкие количества дсРНК (0,66 и 1,22 %), мало отличались по активности от полимера. Повышение содержания дсРНК до 4,2 % в препарате дсРНК-ПГ приводило к резкому усилению эффекта до уровня, индуцированного свободной формой нуклеиновой кислоты (461,1% и 546,6 % соответственно). Комплекс дсРНК с полиглоктином вызывал эффект модуляции, но не приводил к пролонгации действия индуктора интерферона.

Таким образом, определено, что наиболее оптимальной по составу является композиция дсРНК-ПГ с содержанием дсРНК 4,2 %, которую и выбрали для дальнейшего биологического тестирования. Следует отметить, что по сравнению с субстанцией дсРНК содержание дсРНК в препарате дсРНК-ПГ в 4,5 раза ниже. При этом биологические реакции были сходными.

3.5. Выбор оптимального соотношения дсРНК и полимерного носителя поливинилпирролидона в зависимости от его молекулярного веса и процентного содержания в комплексе

В первой серии опытов содержание в препарате дсРНК-ПВП высокомолекулярного (в/м) полимера ПВП с молекулярным весом 35000 Да составляло 30%. Содержание дсРНК в комплексе варьировали от 0,3% до 9,3%. (табл.5).

Таблица 5 - Фагоцитарная активность макрофагов мышей при действии препаратов дсРНК -ПВП

Препарат	Содержание дсРНК, %	Показатели фагоцитарной активности			
		24 часа		5 суток	
		ФА	% КК к контролю	ФА	% КК к контролю
ДсРНК-ПВП	0,3	28,0±2,3	116,6	-	-
ДсРНК-ПВП	2,4	29,7±3,7	124,7	48,6±2,9*	188,7
ДсРНК-ПВП	5,5	41,2±5,0	171,6	38,7±4,3*	150,3
ДсРНК-ПВП	9,3	48,7±3,45	203,1	41,8±2,9*	162,3
Ридостин	9,3	50,5±0,7	208,0	25,7±2,9*	100,0
Физ.раствор	-	24,0±3,9	100,0	25,7±2,9*	100,0

* P < 0,05 различия с контролем (физиологический раствор) достоверны.

Результаты показали, что препарат с содержанием дсРНК в комплексе 0,3 % не вызывает фагоцитозстимулирующего эффекта. Препараты с содержанием дсРНК от 2,4 % до 9,3 % достоверно повышают ФСА. Этот эффект наблюдался в течение 5 дней. В группе животных, получавших ридостин (9,3% дсРНК), такого эффекта не выявлено.

Для дальнейшего изучения комплексов дсРНК-ПВП в качестве оптимального был выбран комплекс с содержанием дсРНК 2,4 %.

Изучение влияния молекулярного веса ПВП на проявление фагоцитозстимулирующей активности перитонеальных макрофагов мышей при введении композиционных препаратов дсРНК-ПВП с содержанием низко- и высокомолекулярного ПВП показало, что через сутки после введения животным комплекса дсРНК-ПВП фагоцитарная активность макрофагов наблюдается после введения, как у ридостина, так и комплекса дсРНК-ПВП с ПВП мМ 35000Да. Но, через 2 суток фагоцитозстимулирующее действие комплексных препаратов с низко- и высокомолекулярным ПВП не только сохраняется, но и усиливается до 128 % и 184 % соответственно. Через 3 суток фагоцитозстимулирующей активностью обладает лишь комплекс дсРНК с высокомолекулярным ПВП, (процент стимуляции - 150%). Данный комплекс приводил к пролонгации активности перитонеальных макрофагов до 5 суток.

Таким образом, для дальнейшего изучения были отобраны комплексы дсРНК-ПГ с содержанием дсРНК 4,2%, и дсРНК-ПВП с содержанием-2,4% дсРНК.

3.6. Данные о биологических свойствах композиционных препаратов

3.6.1. В экспериментах определяли интерферониндуцирующую активность композиционных препаратов дсРНК с ПВП разной молекулярной массой и дсРНК-ПГ в сравнении с ридостином. Исследование проводили на белых беспородных мышцах линии ICR, самцах. Титр интерферона в сыворотках крови мышей, полученные в разные сроки после введения препаратов (5 мг/кг, внутривенно) показали, что препараты дсРНК-ПГ и дсРНК-ПВП сохраняют выраженную интерферониндуцирующую активность. В отличие от ридостина и дсРНК-ПГ, препарат дсРНК-ПВП индуцирует интерферонообразование в течение 2 суток при меньшем в 4 раза содержании дсРНК. Титр интерферона после введения препарата дсРНК-ПВП мышам через 24 часа был равен 128

ИЕ50/0,2мл, через 48 часов - 45 ИЕ/0,2мл, а после введения ридостина - 64 и 18 ИЕ50/0,2мл соответственно.

3.6.2. *Определение среднесмертельных доз комплексных препаратов дсРНК с полиглюкином и ПВП в сравнении с препаратом-прототипом «Ридостин» проводили экспресс-методом по Прозоровскому на белых беспородных мышах при внутривнутрибрюшинном введении. Значение средне-смертельных доз показали, что введение полимеров (поливинилпирролидона или полиглюкина) в состав препарата индуктора интерферона дсРНК вызывает явное снижение токсичности препарата по сравнению с ридостином. Препарат дсРНК-ПГ имеет значение средне-смертельных доз в интервале 260-360 мг/кг, а дсРНК ПВП М.м.35000 - 340-590 мг/кг. Это соответствует показателям для класса малотоксичных препаратов, в то время как ридостин относится к классу среднетоксичных препаратов (ЛД₅₀ - 89-100 мг/кг).*

3.7. Результаты изучения профилактической эффективности препаратов

Целью эксперимента стала оценка профилактической и терапевтической эффективности новых лекарственных форм дсРНК при факторных инфекционных болезнях поросят в условиях широкого производственного эксперимента. Опыты *in vivo* по изучению действия комплексов на поросятах проводили совместно с Лабораторией болезней свиней ИЭВСидВ СО РАСХН на свинокомплексе "Кудряповский".

Исследовали дозовую зависимость однократного в/м введения комплексов (0,1; 0,3 и 0,5 мг/кг) в сравнении с инъекциями вестина (0,5 мг/кг) и интактными животными на 8 группах поросят-аналогов 17-18- дневного возраста. Естественную резистентность поросят оценивали по показателям ОФР и уровня γ -глобулинов.

Как показали результаты исследований, введение всех препаратов не оказывает влияния на показатели белкового обмена (альбумины, α - и β -глобулины). Все эти показатели были в пределах физиологической нормы, как у опытных, так и у интактных животных. Препарат комплекса дсРНК-ПВП в дозах 0,1-0,5 мг/кг повышал уровень гемоглобина у поросят в опытной группы на 10-18%.

Препараты комплекса дсРНК-ПВП и дсРНК-ПГ в дозах 0,3 мг/кг достоверно стимулировали фагоцитоз (ОФР) нейтрофилов крови поросят на 3 сутки после введения (136,5% и 120,6% соответственно), также как и вестин в дозе 0,5 мг/кг (129,1%), в то время, как у интактных поросят наблюдали снижение ОФР до 90,4%. Уровень γ -глобулинов достоверно ($P \leq 0,05$) увеличивался на 3 сутки при введении комплекса дсРНК-ПВП в дозе 0,3 мг/кг до 157,4% и комплекса дсРНК-ПГ в дозах 0,1 - 0,3 мг/кг до 123,2-107,6% соответственно

Таким образом, опыты показали, что препараты комплекса дсРНК-ПВП и дсРНК-ПГ хорошо переносятся поросятами. При этом их эффективные дозы по оценкам показателей резистентности составляют 0,3 мг/кг.

3.6.2. Результаты изучения эффективности препаратов дсРНК-ПВП и дсРНК-ПГ для профилактики факторных инфекционных болезней поросят в производственных условиях

В первом опыте испытывали препараты дсРНК-ПВП и дсРНК-ПГ в целях профилактики при сочетанных инфекционных болезнях на 152 поросятах 21-дневного возраста, живой массой 5,0 кг каждый. Поросят разделили по принципу аналогов на 3 группы по 37 - 40 голов в каждой. За поросятами в течение 40 дней вели клинические наблюдения. Данные эффективности применения различных форм индукторов интерферона для профилактики инфекционных болезней поросят приведены в таблице 6.

Таблица 6 - Эффективность применения различных форм индукторов интерферона для профилактики инфекционных болезней поросят

Группа	до начала опыта		Через 40 дней					
	Количество голов	Средний вес головой	Количество голов	Средний вес головой	пало, гол.	в/убито, %	Среднесуточный привес, г	Сохранность, %
контроль	40	4,7	32	12,2	8	20	189± 7,1	80
дсРНК-ПГ	37	5,3	32	15	5	13,5	242± 6,9*	86,5
дсРНК-ПВП, однократно	37	5,4	33	14	4	10,8	217± 8,3	89,2
Вестин двукратно	38	5	33	12,9	4	10,5	198± 9,4	89,5

*Примечание - $P < 0,05$ по сравнению с контрольной группой

Проведенные эксперименты показали, что изучаемые препараты индукторов интерферона обладают положительным защитным действием на организм поросят 21-дневного возраста, что выражается в снижении падежа и увеличении среднесуточных привесов. При этом существенных различий между их эффектами не обнаруживается, при однократном введении.

Во втором опыте с профилактической целью 342 поросятам 15-дневного возраста вводили внутримышечно дсРНК-ПВП в дозе 0,3 мг/кг ж.м. однократно. Контролем служили 338 поросят аналогичного возраста (им никаких препаратов не вводили). В результате через 30 дней в опытной группе уровень сохранности животных составил 80,7% , а в контрольной - 74,6%. Среднесуточный привес составил в первой группе - 190± 10 г, во второй - 170±9 г или на 11,8% больше, чем в контроле.

В третьем опыте 682 поросятам 45-дневного возраста (в день их передачи на участок доращивания) ввели внутримышечно дсРНК-ПВП в дозе 0,3 мг/кг ж.м. однократно. Контролем служили 670 поросят аналогичного возраста (им никаких препаратов не вводили). В результате через 24 дня в опытной группе уровень сохранности животных составил 90,5%, а в контрольной - 69,5%. Среднесуточный привес в опытной группе составил - 210±11 г, а в контрольной - 160±8г.

В аналогичном опыте по изучению профилактической эффективности препарата дсРНК-ПВП при факторных инфекционных заболеваниях поросят в производственных условиях использовали 529 поросят на свиноподкомплексе

«Томский» ЗАО «Сибирская аграрная группа» Томской области. Свинокомплекс в течение ряда лет стационарно неблагополучен по дизентерии, полисерозиту, колиэнтеротоксемии, трансмиссивному гастроэнтериту, колибактериозу, сальмонеллезу, микоплазмозу, гриппу, РРСС, цирковиральной инфекции.

Пороссятам в возрасте 30 и 38 дней были введены комплекс дсРНК-ПВП (200голов) и препарат дсРНК-ПГ (200голов) по 0,3 мг/кг массы тела и 129 поросят - контроль, которым в эти же сроки вводили в/м по 5 мл алогенной иммунной сыворотки свиней (АИСС).

За всеми пороссятами в течение 70 дней (до перевода на откорм) вели клинические наблюдения.

Из 200 поросят первой группы за 8 дней после первого введения комплекса дсРНК-ПВП заболели с признаками гастроэнтерита 21 поросенок (10,5%) из которых пало 5. Сохранность при передаче на доращивание составила 97,5%.

Из поросят второй группы заболело 26 голов (13%), из которых погибло 8. Сохранность составила 95,8%. В контрольной группе сохранность - 92,2%.

При передаче на доращивание часть слабых поросят из всех групп была передана в сектор Пиг-Балья: из первой группы 61 головы (31,3%) с массой тела 4,4 кг, из второй – 70 голов (36,4%) и из контрольной – 56 голов (44,5%) с массой тела 4,3 кг.

При передаче на доращивание пороссятам опытных групп были повторно введены препараты в тех же дозах. За 70 дней на участке доращивания из первой опытной группы пал 1 поросенок, сохранность составила 99,2%, среднесуточный привес массы тела 388г.

Во второй группе сохранность поросят составила 95,9%, среднесуточный привес массы тела 357г.

В контрольной группе поросят за период доращивания из 66 поросят погибло 12 голов, сохранность составила 81,8% при среднесуточном приросте массы тела 308 г.

Таким образом, к концу опыта в группе поросят после двукратного введения комплекса дсРНК-ПВП сохранность поросят была на 17,4%, а среднесуточный прирост массы тела на 26% выше, чем в контрольной.

В группе поросят, которым аналогично вводили комплекс дсРНК-ПГ, сохранность была на 14,1%, а среднесуточный прирост массы тела на 15,9 % выше, чем у поросят контрольной группы.

Таким образом, препараты комплексов дсРНК-ПВП и дсРНК-ПГ также как и вестин, обладают выраженными профилактическими свойствами при факторных болезнях поросят, повышая их резистентность и уменьшая падеж. После введения композиционных препаратов пороссята лучше растут и развиваются, давая достоверно более высокий среднесуточный прирост массы тела. Характерно, что положительное действие препаратов отмечается при их применении в критические для поросенка сроки (отъем, передача на участок доращивания).

3.6.3. Результаты изучения эффективности одновременного использования дсРНК-ПВП и дсРНК-ПГ и антибиотиков у поросят при факторных инфекционных болезнях

Предварительно у поросят-отъемышей участка доразивания был определен микробный и вирусный фон. При бактериологических и серологических исследованиях установлено носительство у поросят эшерихий, сальмонелл, пастерелл, синегнойной палочки, рота-, парво- и коронавируса, микоплазм, бордетелл и др.

Для проведения опыта отобрали 42 поросенка в возрасте 50 дней с признаками диареи отставших в росте, живой массой тела 4,5-4,9 кг каждый.

Поросят по принципу аналогов разделили на три группы по 14 голов.

Животным первой группы вводили 10%-ный раствор тиамутина в дозе 10мг/кг ежедневно 3 дня подряд и однократно - комплекс дсРНК-ПВП в дозе 0,3 мг/кг.

Животным второй группы вводили 10%-ный раствор тиамутина и препарат дсРНК-ПГ в дозе 0,3 мг/кг трехкратно с интервалом 3 дня, а поросятм 3 группы - только 10%-ный раствор тиамутина. Ежедневно, в течение 14 дней, вели наблюдение за клиническим состоянием поросят (табл.7).

Эффективность разных схем применения препаратов оценивали по приросту живой массы и уровню сохранности поросят.

Из приведенных ниже данных табл. 7 видно, что наилучший лечебный эффект от сочетанного применения тиамутина и комплекса дсРНК-ПВП получен в первой группе, в которой пал один поросенок из 14, остальные все выздоровели. Среднесуточный прирост живой массы в этой группе был в 1,7 раза выше, чем в контрольной группе.

Менее выраженный эффект был при применении препарата дсРНК-ПГ.

Таблица 7 - Терапевтическая эффективность применения дсРНК-ПВП и дсРНК-ПГ с одновременным использованием тиамутина при факторных болезнях поросят

Группа	На начало опыта		Через 14 дней					Сохранность, %
	Кол -во голов	Средн. вес 1 головы	Кол -во голов	Средн. вес 1 головы	Падеж		Среднесут привес, г	
					гол.	, %		
Тиамутин ДсРНК-ПВП	14	4,7	13	6,2	1	7,1	107±7,7*	92,9
Тиамутин ДсРНК-ПГ	14	4,9	11	6,2	3	21,4	93±7,3*	78,6
Тиамутин (контроль)	14	4,5	10	5,4	4	28,6	64±8,0	71,4

Примечание - $P < 0,05$ по сравнению с контрольной группой.

В связи с этим в следующем производственном опыте для профилактики инфекционных болезней изучили эффективность применения только комплекса дсРНК-ПВП в сравнении с препаратом левотетрасульфимом. В опыт взяли 308 поросят-аналогов в возрасте 18 дней, живой массой 4,3 кг каждый. Данные представлены в табл. 8.

Таблица 8 - Лечебно-профилактическая эффективность препарата комплекс дсРНК-ПВП с одновременным использованием левотетрасульфина

Группа	до начала опыта		Через 24 дня					
	Количество голов	средний вес 1 головы	Количество голов	средний вес 1 головы	пало		Среднесуточный привес, г	Сохранность, %
					гол.	в/убито, %		
ДсРНК-ПВП	73	4,3	67	7,2	6	8,2	122± 10	91,8
ДсРНК-ПВП и левотетрасульфин	53	4,5	48	7,9	5	9,4	145± 10,5 *	90,6
Левотетрасульфин	85	4,2	74	6,6	11	12,9	102± 10,1	87,1
Контроль (АИСС)	97	4,3	80	7,1	17	17,5	117± 10,4	82,5

* Примечание - $P < 0,05$ по сравнению с контрольной группой.

Таким образом, у животных второй группы, которым одновременно вводили комплекс дсРНК-ПВП и левотетрасульфин, среднесуточный прирост массы тела оказался выше на 20%, чем у животных остальных групп. Лучшая сохранность была среди поросят первой группы, где применяли только комплекс дсРНК-ПВП - 91,8 %. Из этого следует, что комплекс дсРНК-ПВП способствует повышению терапевтической эффективности антибактериального препарата тиамутин и лечебно-профилактической эффективности левотетрасульфина в сравнении с алогенной иммунной сывороткой свиней

4. ВЫВОДЫ

1. Усовершенствована технология производства биомассы киллерных дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* путем замены источника аминного азота из дорогостоящего пептона на автолизат пекарских дрожжей и источника углерода из нестандартизируемого источника - мелассы - на сахар. Это позволило повысить содержание дсРНК в 1 кг дрожжей более, чем в 3 раза, по сравнению с содержанием дсРНК в биомассе, выращенной на среде с мелассой и пептоном в промышленном масштабе. Себестоимость производимой биомассы снижается более, чем в 10 раз

2. Использование модифицированной газодинамической вихревой мельницы для дезинтеграции микроорганизмов дрожжей в жидком потоке привело увеличению выхода целевого продукта на 20-30 % и уменьшению энергозатрат в 2 раза.

3. Установлено влияние ПВП и ПГ на физико-химические, структурные свойства дсРНК, что выразилось в следующем:

- повышалась устойчивость дсРНК к действию нуклеаз крови человека композиционных препаратов дсРНК с полиглюкином и поливинилпирролидоном на 10-15% и 20-30%, соответственно

- использованные полимеры повышали уровень растворимости препаратов, причем скорость растворения препарата зависела от вида полимера

- ПВП и ПГ в составе композиционных препаратов не изменяет первичную, вторичную и конформационную структуру дсРНК.

4. Исследуемые композиционные препараты оказывали различные эффекты на биологические реакции организмов животных.

Препарат дсРНК-ПВП, характеризующийся наличием слабых водородных

связей между дсРНК и ПВП, привел к более длительной активации фагоцитоза (до 5 суток) и индукции интерферона (до 2 суток), чем референс препарат ридостин. Содержание дсРНК при этом в 3-4 раза ниже, чем в ридостине.

Эффекты препаратов дсРНК-ПГ и ридостина по показателю фагоцитоза и уровня интерферона были сходными. Содержание дсРНК в композиционном препарате в 2 раза ниже, чем в ридостине.

5. Проведенное исследование показало, что использование приемов физической иммобилизации дсРНК дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* киллерных штаммов с полисахаридами (ПГ) и с синтетическими высокомолекулярными полимерами (ПВП) позволило создать новые индукторы интерферона с улучшенными свойствами и является перспективным подходом для создания новых препаратов дсРНК.

6. Препарат дсРНК-ПВП и дсРНК-ПГ обладают выраженными профилактическими свойствами при факторных болезнях поросят, повышая их резистентность, продуктивность и уменьшая падеж. Комплекс дсРНК-ПВП способствует повышению терапевтической эффективности антибактериального препарата тиамутин и лечебно-профилактической эффективности левотетрасульфина в условиях широкого производственного эксперимента.

5. ПРАКТИЧЕСКИЕ ПРЕДЛОЖЕНИЯ

Результаты, полученные при усовершенствовании биотехнологических стадий процесса культивирования биомассы киллерных штаммов дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* и стадии дезинтеграции дрожжей, внедрены в ООО «Диафарм» и вошли в Промышленные регламенты производства ПР № 103.0063.03.

Результаты научных исследований разработки состава композиций дсРНК-ПВП и дсРНК-ПГ рекомендуется использовать для разработки схем применения препаратов и составления проектов Фармакопейных статей предприятия на лекарственные формы.

Разработанные и апробированные схемы применения препаратов используются на свинокомплексах ОАО «Кудряшовское» Новосибирской области и ЗАО «Сибирская аграрная группа» Томской области, и могут быть использованы для разработки «Наставления по применению».

Для профилактики факторных инфекционных болезней поросят рекомендуется применять препараты дсРНК-ПВП и дсРНК-ПГ в критические периоды жизни (в зависимости от сроков отъема) на 15, 25, 45 или 30, 38 дни в дозе 0,3 мг/кг.

Для терапии факторных инфекционных болезней поросят рекомендуется сочетанное применение препарата дсРНК-ПВП в дозе 0,3 мг/кг однократно и антибиотиков (10 %-ный раствор тиамутина в дозе 10 мг/кг или левотетрасульфид в дозе 0,5 мг/кг) или дсРНК-ПГ в дозе 0,3 мг/кг трехкратно.

Основные результаты, полученные автором в процессе работы, вошли в методические рекомендации «Применение иммуностимуляторов дсРНК-ПВП и дсРНК-ПГ в свиноводстве», рассмотрены и утверждены учеными советом ГНУ ИЭВСиДВ СО РАСХН (протокол № 1 от «17» января 2006 г) и подсекцией

«Инфекционная патология животных в регионе Сибири и Дальнего Востока» отделения ветеринарной медицины Россельхозакадемии (протокол № 1 от «17» января 2006 г).

6. СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Двуспиральные (дс)РНК индукторы интерферона для профилактики и лечения инфекционной патологии позвоночных /Соавт. Аликин Ю.С., Масычева В.И., Даниленко Е.Д.// Российско-Канадский коллоквиум ISTC (МНТЦ) Canadian biological sciences colloquium. Moscow, 15-17 September 2004, p. 268-273.
2. Положительное решение о выдаче патента на изобретение «Способ лечения и профилактики желудочно-кишечных инфекционных болезней поросят в условиях промышленного свиноводства»/ Соавт. Прудников С.И., Духовский А.А., Аликин Ю.С //по заявке № 2004111 060/14(011839) от 30 03 2004.
3. Патент № 2172631 МКИ С 12N 15/00 Индукторы интерферона пролонгированного действия, /Соавт. Масычева В.И., Аликин Ю. С.// НИКТИ БАВ ГНЦ ВБ «Вектор» РФ. опубл. БИ 24. 01
4. Патент № 2215781 МКИ С12N1/18 и 12R1:865 Питательная среда для культивирования киллерных дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*./Соавт. Терещенко Т.А., Беспярых Э.В. ООО «Диафарм»-№2000111086; заявл.03.05.2000
5. Влияние вида носителя, технологических приемов создания новых лекарственных форм на биологическую активность дсРНК дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*./Соавт. Масычева В.И., Карпова С.Ф., Даниленко Е.Д., Фаина В.А., Аликин Ю.С., Малахова Т.В.//IX Международная конференция и дискуссионный научный клуб Новые информационные технологии в медицине и экологии.- Украина. Крым.Ялта-Гурзуф.2001.
6. Изучение безвредности и определение оптимальных иммуностимулирующих доз препаратов комплекс А и комплекс В на поросятах/Соавт. Прудников С.И., Духовский А.А., Аликин Ю.С, Кропачева Т.В.//Актуальные вопросы ветеринарии: Материалы науч. практ.конф. фак .вет. мед. НГАУ/ Новосибир. гос. аграр. ун-т. - Новосибирск, 2001.-с.72-73.
7. Биологические эффекты пролонгированных форм индукторов интерферона у высших и низших позвоночных./Соавт. Аликин Ю.С., Даниленко Е.Д., Масычева В.И., Духовский А.А., Прудников С.И., Щелкунов И.С.//IX Международная конференция и дискуссионный научный клуб Новые информационные технологии в медицине и экологии.- Украина. Крым. Ялта-Гурзуф.2001- с.173.
8. Поиск рациональных схем использования препаратов комплекс А и комплекс В на поросятах в целях повышения уровня неспецифической резистентности/Соавт. Духовский А.А., Прудников С.И., Аликин Ю.С.//Актуальные вопросы ветеринарии: Материалы науч.-практ. конф. фак. вет. мед. НГАУ/Новосиб. гос. аграр.ун-т.-Новосибирск,2001.-с.70-71.10.
9. Технологические аспекты получения индукторов интерферона пролонгированного действия./Соавт. Масычева В.И., Карпова С.Ф., Даниленко Е.Д., Фаина В.А., Аликин Ю.С.// XIV Международная конференция и

дискуссионный научный клуб Новые информационные технологии в медицине и экологии.- Украина. Крым. Гурзуф.2000 - с.93-94.

10. Индукторы интерферона в лечении и профилактике инфекционных заболеваний./Соавт. Масычева В.И., Аликин Ю.С., Лосева М.И., Даниленко Е.Д// IIIV Международная конференция и дискуссионный научный клуб Новые информационные технологии в медицине и экологии - Украина. Крым. Гурзуф.2000 - с. 105-106.

11. Дезинтеграция микроорганизмов в вихревой мельнице/Соавт. Касаткина Н.С., Лебедев А.В., Правдина М.Х// Обработка дисперсионных материалов Периодический сборник научных трудов, вып. 9, НПО «Вотум» ИБКХ НАНУ Укр. ХО, 1999.- с. 66-64.

Откопировано И П Сердюкова
Тираж 100 экз подписано в печать 25 01 2006
633010 г Бердск НСО ул Химзаводская, 9

2006A

2535

R-2535