

А. Е. Гуляев¹, Э. Т. Шульгау¹, Ш. Д. Сергазы^{1,2}, Н. В. Юрина³, А. М. Горячкин⁴,
С. С. Богачев⁵, А. С. Проскура^{5,6}

ИССЛЕДОВАНИЕ ОБЩЕЙ И СПЕЦИФИЧЕСКОЙ ТОКСИЧНОСТИ РЕКОМБИНАНТНОГО АНГИОГЕНИНА ЧЕЛОВЕКА

Поступила в редакцию 28.12.2021. Принята к печати 17.04.2022.

При исследовании на мышах острой токсичности препарат рекомбинантного ангиогенина человека не проявлял токсичных свойств, животные успешно переносили максимально достижимую дозу 12 г/кг массы при внутривенном введении. При оценке хронической токсичности крысам на скарифицированный участок кожи наносили ангиогенин 0,01 % в форме геля в течение месяца. Не зафиксировано каких-либо существенных изменений и различий между группой, получавшей ангиогенин, и контрольной группой по стандартным биохимическим, гематологическим параметрам и по результатам гистологического исследования тканей животных. Исследование местно-раздражающего действия на беспородных кроликах шиншилла показало отсутствие такового при использовании геля ангиогенина 0,0025 %. Препарат ангиогенина не вызывал сенсibilизации морских свинок, что подтверждено проведением теста кожной анафилаксии, и не индуцировал развитие реакции гиперчувствительности замедленного типа у мышей. У препарата ангиогенина не выявлено иммунотоксического и эмбриотоксического действия, отсутствовало мутагенное и канцерогенное действие. В экспериментах на мышах показано отсутствие стимуляции роста опухоли при введении ангиогенина. Токсические эффекты исследуемого препарата ангиогенина, включая системные, местно-раздражающие, кожно-резорбтивные и сенсibilизирующие свойства, не выражены. Препарат рекомбинантного ангиогенина человека представляет собой безопасное фармакологическое вещество.

Ключевые слова: острая токсичность, хроническая токсичность, иммунотоксичность, эмбриотоксичность, мутагенная активность.

Ангиогенин, также известный как секретиремая рибонуклеаза 5 (РНКаза 5), является членом суперсемейства специфических рибонуклеаз позвоночных, это мощный индуктор образо-

вания кровеносных сосудов, играющий ведущую роль в различных физиологических и патологических процессах, включая туморогенез, нейропротекцию, воспаление [1], заживление ран [2] и регенерацию системы кроветворения [3, 4]. Ангиогенная активность прямо связана с другими факторами ангиогенеза, такими как VEGF, FGF и EGF [5]. Для активации роста новых сосудов секретиремый ангиогенин должен связаться с экстраклеточным актином, локализованным на цитоплазматической мембране эндотелиальной клетки [6, 7]. В результате такого неинтернализованного взаимодействия активируются специфические секретиремые матричные протеазы, разрушающие базальную мембрану и внеклеточный матрикс [8], эндотелиальная клетка отрывается от эндотелиального слоя и выходит за его пределы. Активированные эндотелиальные клетки экспрессируют специфический к ангиогенину рецептор Plexin-B2, который связывает экстраклеточный ангиогенин и клатрин-зависимым эндоцитозом

¹ РГП «Национальный центр биотехнологии», 010000 Казахстан, г. Нур-Султан, Кургальжинское ш., 13/5.

² Частное учреждение «National Laboratory Astana», Назарбаев Университет, 010000 Казахстан, г. Нур-Султан, пр-т Кабанбай Батыра, 53.

³ Автономная некоммерческая организация «Региональный центр высоких медицинских технологий», 630112 Россия, г. Новосибирск, ул. Фрунзе, 71/1.

⁴ ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 630091 Россия, г. Новосибирск, Красный пр-т, 52.

⁵ ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр «Институт цитологии и генетики Сибирского отделения РАН», 630090 Россия, г. Новосибирск, пр. акад. Лаврентьева, 10.

⁶ labmolbiol@mail.ru

транспортирует фактор в цитоплазму [9]. Локализированный в цитоплазме ангиогенин, взаимодействуя с актином и миозином, способствует быстрому формированию стресс-фибрилл и фокусу адгезии, что способствует миграции разобщенных эндотелиальных клеток [10]. Внутри клетки ангиогенин существует в 2 формах: в комплексе с ингибитором рибонуклеаз RI и внутриядерной локализации. Закомплексованный ангиогенин не способен индуцировать ангиогенез. Ангиогенная функция в полной мере принадлежит только внутриядерному ангиогенину [5, 11, 12].

Таким образом, часть интернализовавшегося ангиогенина избегает ассоциации с RI и транслоцируется в ядро клетки, оторвавшись от эндотелиального слоя. Локализация в ядре ангиогенина приводит к повышению биогенеза рибосом за счет гидролиза промотор-ассоциированных блокирующих транскрипцию РНК, причем в этом процессе также участвуют фактор роста эндотелия сосудов (VEGF) и фактор роста фибробластов-2 (FGF-2) [4, 5, 9, 13 – 15]. Указанные процессы совместно многократно усиливают синтетические процессы в эндотелиальной клетке, что способствует пролиферации и формированию новых сосудов [13].

В мигрировавших клетках в условиях клеточного стресса (несвойственная тканевая локализация, гипоксия, трофический дисбаланс) ядерный ангиогенин меняет локализацию и накапливается в стрессовых гранулах в цитозоле [12, 14, 16 – 18]. Стресс-гранулы содержат нетранслируемую мРНК, РНК-связывающие белки, транспортные РНК, которые образуются в ответ на клеточный стресс. Специфический гидролиз ангиогенином петли антикодона молекул транспортных РНК приводит к появлению tRF фрагментов. Именно эти РНК гидролизаты индуцируют трансляционный сайленсинг или деградируют молекулы зрелой мРНК, что приводит к подавлению общеклеточного синтеза белка [19 – 23]. При этом высвободившаяся анаболическая энергия направляется на синтез антиапоптотических генов, повышение выживаемости клеток и индукцию пролиферативной активности [3, 18, 19, 24]. В конечном итоге пролиферирующие, свободно расположенные эндотелиальные клетки образуют новую кровеносную трубку, которая укрепляется клетками гладкой мускулатуры, формируя новый кровеносный сосуд [15]. В этом процессе вторую значимую роль играют расположенные рядом фибробласты, которые в ответ на воздействие ангиогенина взаимодействуют с эндоте-

лиальными клетками и секретируют специфические белки внеклеточного матрикса, определяющие фолдинг нового эндотелиального слоя в функциональную трубку нового сосуда [25, 26].

Помимо основной функции, активации ангиогенеза, этот полифункциональный фактор действует как системный балансный фактор плазмы крови, регулирующий развитие воспалительного процесса. Так, описано противовоспалительное действие ангиогенина при экспериментальном воспалении, индуцированном IL-1b или TNF- α . Кроме того, известно, что ангиогенин ингибирует дегрануляцию полиморфноядерных лейкоцитов, таким образом suppressing провоспалительную активность нейтрофилов [27 – 33]. Противовоспалительное действие ангиогенина напрямую связано с его способностью положительно влиять на процесс заживления ран как непосредственно за счет неоваскуляризации раневой области, так и за счет активации фибробластов и секретируемых ими факторов [1, 2, 34 – 36].

Цель работы — исследовать общую и специфическую токсичность рекомбинантного ангиогенина человека.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Препарат рекомбинантного ангиогенина предоставлен фирмой-производителем ООО «Лаборатория Ангиофарм» (Новосибирск) [37].

В экспериментах использованы беспородные кролики шиншилла, морские свинки, крысы линии Вистар, беспородные мыши ICR и мыши линий Balb/c и CBA. Животных содержали в отапливаемом, вентилируемом помещении, они имели свободный доступ к корму и воде. Пищевая и биологическая ценность рациона полностью удовлетворяла физиологические потребности животных. Все эксперименты с животными одобрены локальным этическим комитетом Института цитологии и генетики СО РАН и проведены в строгом соответствии с положениями Директивы 2010/63/EU Европейского парламента и совета ЕС от 22 сентября 2010 г. по охране животных, используемых в научных целях, а также требованиями и рекомендациями Руководства по содержанию и использованию лабораторных животных.

Для определения биодоступности ангиогенина при местном применении ангиогенин в количестве 400 мг наносили на выбритую поверхность кожи (площадь ~ 2 см²) 7 интактных крыс (согласно рекомендациям по терапевтическому использованию геля ангиогенина на 1 см² поверхности наносят 200 мг геля). Оцени-

вали изменения фонового уровня ангиогенина в крови через 5, 30, 60 и 180 мин после нанесения с использованием диагностической тест-системы (ИФА набор, BCM Diagnostics) для определения ангиогенина.

Гематологические показатели (содержание тромбоцитов, гемоглобина, лейкоцитов, лейкоцитарная формула) определяли унифицированными клиническими методами. Забирали кровь для мониторинга гематологических показателей из хвостовой вены.

Концентрацию общего белка в плазме крови определяли унифицированным биуретовым методом, билирубина — по Иендрашеку с использованием наборов реактивов производства фирмы «Агат – Мед»; активность аланинтрансаминазы, аспартаттрансаминазы, креатинина, мочевины, глюкозы — с использованием наборов реактивов производства фирмы «Vital Diagnostics SPb». Правильность контролировали параллельным анализом контрольных сывороток «RANDOX» серии № 304SN и 259SE. Фотометрировали на спектрофотометре PD-303UV.

Мазки-отпечатки с раневой поверхности для цитологических исследований получали методом «поверхностной биопсии», предложенной М. Ф. Камаевым в 1954 г. Согласно данному методу материал для исследования берут лёгким соскобом поверхностного слоя раны хирургическим скальпелем. Полученный таким образом материал переносили на предметное стекло. С целью фиксации препарат погружали в смесь Никифорова (15 мин), затем окрашивали по методу Романовского – Гимза. Микроскопия мазков осуществляли под иммерсией.

С целью взятия материала для морфологического исследования животных выводили из эксперимента декапитацией. Сроки выведения животных из эксперимента — 3-й, 7-й, 10-й, 14-й и 21-й день после формирования модели. Материалы забирали на границе здоровой и повреждённой кожи, фиксировали в 4 % забуференном формалине. Дальнейшую обработку и заливку материала в парафин осуществляли по общепринятой патогистологической методике. Срезы толщиной 5 – 7 мкм окрашивали гематоксилин-эозином. Все гистопрепараты исследовали на микроскопе Axioskop-2 (Carl Zeiss).

Исследование острой токсичности препарата ангиогенина проведено на мышах при воздействии максимальной технически достижимой дозы для внутрижелудочного введения. Вводили 40 % раствор субстанции препарата ангиогенина в объёме из расчёта 3 % от массы тела, т. е. 12 г/кг лекарственной формы. Иссле-

дуемая группа состояла из 5 самцов и 5 самок. Ежедневно в течение 2 недель наблюдали за состоянием и поведением мышей, животных во время эксперимента трижды взвешивали.

Исследование хронической токсичности проведено на крысах обоего пола массой 200 – 240 г (по 20 особей в каждой группе). Для оценки хронической токсичности использовали накожный путь введения ангиогенина 0,01 %. Контрольная группа получала используемый растворитель. При этом выстригали область кожи на спине 2 × 3 см, после выстригания кожу искусственно скарифицировали (наносили неглубокие порезы и ранки). Выстригание волос и скарификацию повторяли раз в неделю. Препарат наносили каждый день тонким слоем на всю поверхность кожи, лишённой волос (~100 мг препарата на животное). Каждый раз перед нанесением препарата кожу очищали и промывали влажным ватным тампоном. Длительность эксперимента составила 1 месяц. Вели мониторинг массы животных как основного интегрального показателя, оценивали их поведение, а также наблюдали за общим состоянием животных. После завершения нанесения препарата проводили эвтаназию животных. Гибель животных за время эксперимента не зарегистрирована. Проведено гистологическое исследование образцов тканей животных, взятых при эвтаназии, морфологическое исследование органов животных, биохимическое исследование сыворотки крови и гематологическое исследование.

Исследования местно-раздражающего действия проводили по методу Драйза на 6 беспородных кроликах шиншилла [38]. Салфетки наносили на выстриженные участки кожи на боках площадью 10 см². Один бок скарифицировали скальпелем, а другой сохраняли интактным. Исследуемые участки кожи покрывали салфеткой, пропитанной гелем ангиогенина (0,0025 %), в полиэтиленоксиде, приклеивая ее лейкопластырем, и оставляли на 24 ч. Реакцию кожи регистрировали через 30 мин после снятия салфетки и через 72 ч повторно. В контрольной группе использовали салфетки, пропитанные полиэтиленоксидом.

Для оценки аллергизирующего действия использовали тест активной кожной анафилаксии и реакцию гиперчувствительности замедленного типа. Исследование аллергизирующих свойств ангиогенина посредством постановки теста кожной анафилаксии проведено на 20 морских свинок обоего пола с массой тела 200 – 270 г. Для оценки активной кожной анафилаксии сенсibilizировали морских свинок

методом накожной аппликации препарата. Препарат наносили на выстриженный участок кожи размером 2×2 см ежедневно в течение 10 дней. Раствор равномерно распределяли по поверхности кожи, после чего каждую свинку отсаживали в отдельную коробку до полного высыхания препарата. Для оценки аллергизирующих свойств препарата после 10-й аппликации на противоположном боку выстригали участок размером 2×2 см и наносили разрешающую дозу препарата. Наличие у препарата кожно-сенсibiliзирующих свойств оценивали по наличию гиперемии, отёка и болезненности кожи при пальпации.

Исследование реакции гиперчувствительности замедленного типа проведено на 32 белых беспородных мышах ICR, самцах, с массой тела 25 – 28 г. Сенсibiliзировали однократно внутрикожным введением в основание хвоста 60 мкл эмульсии препарата ангиогенина в полном адьюванте Фрейнда. Контрольным животным вводили полный адьювант Фрейнда в том же объёме. Для выявления сенсibiliзации через 5 суток мышам в заднюю лапу вводили 40 мкл 10 мМ раствора ангиогенина. Тестирующие дозы препарата вводили сенсibiliзированным и несенсibiliзированным мышам в подушечку одной из лап. В другую лапу вводили физиологический раствор в том же объёме. Через 24 ч после введения тестирующей дозы определяли массу опытной и контрольной лап и по их разнице вычисляли индекс реакции (ИР, %):

$$\text{ИР} = [(m_{\text{опыт}} - m_{\text{контроль}}) / m_{\text{контроль}}] \cdot 100 \%,$$

где $m_{\text{опыт}}$ — масса опытной стопы, $m_{\text{контроль}}$ — масса контрольной стопы.

Для ряда интегральных тестов по оценке иммунотоксичности использовали беспородных мышей обоего пола. Для характеристики иммунотоксичности ангиогенина оценивали количество антителообразующих клеток, общую клеточность иммунокомпетентных органов (селезёнка, тимус, костный мозг), фагоцитарную активность макрофагов в НСТ-тесте. Иммунотоксичность оценивали при воздействии максимальной технически достижимой дозы для внутрижелудочного введения. Вводили 40 % раствор препарата на основе ангиогенина в объёме из расчёта 3 % от массы тела, т. е. 12 г/кг лекарственной формы. В каждой экспериментальной и контрольной группе находилось по 10 животных.

Для оценки гуморального иммунного ответа определяли число антителообразующих клеток в селезёнке мышей при иммунизации Т-зависи-

мым антигеном. Препарат вводили в течение 5 дней. На 5-й день внутрибрюшинно вводили антиген — эритроциты барана. После иммунизации на 5-е сутки определяли число антителообразующих клеток. Проводили эвтаназию с помощью цервикальной дислокации, извлекали селезёнку и готовили клеточную суспензию при помощи стеклянного гомогенизатора. Суспендировали в растворе Хэнкса. Клеточную взвесь спленоцитов вместе с эритроцитами барана и комплементом морской свинки термостатировали при 37 °С в течение 45 мин, затем микроскопировали и подсчитывали абсолютное и относительное содержание антителообразующих клеток.

Определяли общую клеточность иммунокомпетентных органов на 7-е и 14-е сутки наблюдения. Во время наблюдения животные получали исследуемые препараты. Проводили эвтаназию с помощью цервикальной дислокации, извлекали селезёнку, тимус и костный мозг. С помощью стеклянного гомогенизатора готовили клеточную взвесь в растворе Хэнкса. Суспензии отмывали и центрифугировали. Подсчитывали концентрацию ядродержащих клеток в 3 % уксусной кислоте. Определяли абсолютные и относительные значения количества клеток.

Для оценки влияния препарата на неспецифическое звено иммунной системы определяли фагоцитарную активность макрофагов в НСТ-тесте на мышах обоего пола. У животных после внутрибрюшинного введения раствора Хэнкса собирали экссудат перитонеальных макрофагов. Предметные стёкла с суспензией макрофагов рабочим раствором нитросинего тетразолия (НСТ), раствором Хэнкса во влажной камере термостатировали при 37 °С, затем после фиксации окрашивали 1 % нейтральным красным. Подсчитывали макрофаги в спонтанном и индуцированном тесте.

Исследования эмбриотоксичности ангиогенина проводили на лабораторных крысах линии Вистар, самцах и самках массой 180 – 220 г в возрасте 90 – 120 дней. В каждой группе находилось по 45 особей (30 самок и 15 самцов). Животных разделяли на 2 группы, контрольную и экспериментальную, получавших ангиогенин 0,1 % накожно на площадь скарифицированной кожи 2×3 см. Самцов и самок содержали отдельно, затем подсаживали. Начало экспозиции препарата — за 45 – 50 дней перед посадкой для самцов, за 15 – 20 дней перед посадкой для самок. Делали вагинальные мазки для определения фазы «эструс» у самок, факт спаривания определяли по наличию сперматозоидов в маз-

ке. После регистрации спаривания самцов отсаживали и не использовали далее в эксперименте. Исследование эмбрионов проводили на 20-й день беременности.

Исследование включало в себя изучение эмбриотоксического и тератогенного действий, регистрируемых в пренатальном периоде развития. Проводили следующие тесты:

- оценка количества живых и мёртвых эмбрионов, мест имплантации, жёлтых тел для пре- и постимплантационной смертности;
- кранио-каудальный размер, масса плодов;
- оценка аномалий развития плодов по состоянию внутренних органов по Вильсону (кровоизлияние в брюшную полость, эктопия почек, кровоизлияние в перикард, микроцефалия);
- оценка аномалий развития плодов по показателям развития костного скелета (точек осификации) по Доуссону-Дыбану;
- динамика массы тела самок во время эксперимента (с начала кормления, еженедельно).

Дополнительно оценивали общее состояние животных (внешний вид, поведение, двигательная активность, состояние шерстного покрова) и поедание корма.

Оценивали мутагенную активность препарата ангиогенина методом учета способности исследуемой субстанции индуцировать генные мутации у индикаторных микроорганизмов в тесте Эймса. Использовали ауксотрофные по гистидину штаммы *Salmonella typhimurium* TA98, TA100, TA1535 и TA1537.

Для оценки мутагенности в тесте Эймса использовали штаммы бактерий *Salmonella typhimurium*, в гистидиновый оперон которых внесены точковые мутации, ведущие к нарушению синтеза гистидина и неспособности бактерий к росту на среде, не содержащей гистидин. Индукция в результате мутагенного воздействия обратных мутаций по типу замены пар оснований или сдвига рамки считывания в гене *His* этих тестерных штаммов приводит к реверсии прототрофности бактерий по этим аминокислотам и способности к росту на безгистидиновой среде. Тестерные штаммы подвергали воздействию различных концентраций исследуемого образца и выращивали на среде, не содержащей гистидин. Исследуемые концентрации гелевой формы ангиогенина составили 4, 8, 10, 20, 30 и 40 мг/мл. Мутагенный потенциал оценивали по индукции ревертантов от ауксотрофности по гистидину к прототрофности, способных к выживанию и росту на безгистидиновой среде. Штаммы *Salmonella typhimurium* TA100 и TA1535 позволяют регистрировать индукцию мутаций по типу замены пар основа-

ний, штаммы *Salmonella typhimurium* TA98 и TA1537 — мутаций по типу сдвига рамки считывания.

Для исследования мутагенных свойств препарата ангиогенина в тесте Эймса на *Salmonella typhimurium* в микропланшетном формате использовали набор Ames MPF™ Penta I (Xenomatrix, Швейцария). Штаммы бактерий, входящие в набор, соответствуют требованиям руководства по оценке химических соединений OECD 471.

Около 10^7 бактерий *S. typhimurium* подвергали воздействию тестируемого образца в 6 концентрациях (а также воздействию позитивного и негативного контролей) в течение 90 мин (время, достаточное для прохождения 2 клеточных делений) в среде, содержащей гистидин. Через 90 мин экспонированные культуры разводили в рН-индикаторной среде, не содержащей гистидин, и разливали по 48 лункам 384-луночной микротитровальной планшеты. В течение 2 дней бактерии, претерпевшие реверсию к прототрофности по этим аминокислотам, формируют колонии. Продукты метаболизма бактерий снижают значение рН-индикаторной среды, что приводит к изменению ее цвета в лунках. Для каждой концентрации тестируемого образца подсчитывали количество лунок с ревертантными колониями, полученные показатели сравнивали с показателем для негативного контроля (растворитель). Увеличение количества ревертантных колоний под действием тестируемого образца по сравнению с негативным контролем свидетельствует о том, что образец проявляет мутагенную активность в тесте Ames MPF™ Penta I. Для статистической обработки данных каждую концентрацию исследовали в 3 повторностях.

По результатам эксперимента рассчитывали среднее число позитивных лунок на концентрацию и стандартное отклонение, а также кратность превышения числа ревертантов относительно негативного контроля (растворитель). Кратность превышения менее чем 2,0 не рассматривается как позитивный эффект, поскольку различия недостоверны.

В опытах *in vivo* на мышках-самцах линии Balb/c в качестве канцерогена использовали раствор 9,10-диметилбензантрацена в ацетоне, который наносили на межлопаточную область спины в дозе 200 мкг на животное один раз в неделю в течение 5 недель ($n = 100$). В течение последующего месяца учитывали количество образовавшихся папиллом. Гель ангиогенина (0,0025 %) наносили на выбритую поверхность кожи размером 1×1 см в межлопаточной

области ежедневно на протяжении 5 недель ($n = 100$).

Мышам-самкам СВА прививали по 2 – 5 млн клеток опухоли Кребс-2 внутримышечно в правую заднюю лапу. После достижения опухоли размеров 125 – 200 мм³ начинали ежедневные инъекции ангиогенина, который вводили в течение 10 суток в объеме 0,2 мл в дозе 0,5 мкг/мышь внутривенно ($n = 7$) или внутриопухолево ($n = 7$) или в дозе 15 мкг/мышь, чередуя внутривенное и внутриопухолево введение ($n = 10$). Контрольные группы мышей не получали никаких инъекций ($n = 7$).

Статистически обрабатывали полученные результаты при помощи программ Microsoft Excel и Statistica 8.0 методами непараметрической статистики с оценкой значимости различий по U -критерию Манна-Уитни. На рисунке, в таблицах и тексте приведены средние значения \pm стандартное отклонение.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Определяли биодоступность ангиогенина при местном применении по оценке изменений фонового уровня ангиогенина в крови крыс через 5, 30, 60 и 180 мин после нанесения. Фоновое значение ангиогенина в сыворотке крови — 870,0 \pm 94,8 пкг/мл, уровень концентрации ангиогенина после нанесения исследуемого препарата на поверхность кожи ни в одном случае достоверно не превысило фонового значения: 5 мин — 710,0 \pm 102,3 пкг/мл; 30 мин — 890,0 \pm 78,5 пкг/мл; 60 мин — 707,0 \pm 90,6 пкг/мл; 180 мин — 800,0 \pm 104,8 пкг/мл. При местном накожном применении гель ангиогенина обла-

дает низкой биодоступностью и не меняет фоновый уровень эндогенного ангиогенина в крови экспериментальных животных.

Исследование острой токсичности препарата ангиогенина проведено на мышах при воздействии максимальной технически достижимой дозы для внутрижелудочного введения. За время эксперимента не наблюдали гибели животных и диспепсических явлений, не отмечено выраженных изменений в поведении. В течение всего периода наблюдения имел место нормальный темп прироста массы тела, составивший 4,7 мг/г/сутки.

Принципиальных различий в гематологических показателях и характеристиках гемостаза у животных, получивших препарат на основе ангиогенина, по сравнению с контрольными животными не обнаружено (табл. 1).

Макроскопически все исследованные органы экспериментальных животных (головной мозг, сердце, печень, почки, селезёнка, тонкий и толстый кишечник, гонады) имели обычный цвет, размеры и форму, характерные для данного вида животных. Величины индексов массы внутренних органов не выходят за рамки видовой нормы (табл. 2).

В группе животных, которым вводили препарат на основе ангиогенина, в тканях печени (рис. 1, А) и кишечника (рис. 1, В) отмечена мелкоочаговая, скоплениями по 2 – 5 шт. лимфоидная инфильтрация. Отмечены невыраженные изменения в печени, признаки баллонной дистрофии отдельных клеток. Наблюдается выраженная гиперплазия лимфоидных элементов селезёнки, рисунок фолликулов не прослеживается, среди них обнаруживаются гигант-

Таблица 1. Гематологические показатели и характеристики гемостаза после однократного внутрижелудочного введения препарата на основе ангиогенина

Показатель	n	Ангиогенин	n	Контроль
Гемоглобин, г/л	10	137,0 \pm 9,1	5	136,0 \pm 2,5
Эритроциты, 10 ¹² /л	10	5,4 \pm 0,6	5	6,2 \pm 1,0
Ретикулоциты, %	10	7,0 \pm 1,3	5	6,0 \pm 3,7
Лейкоциты, 10 ⁹ /л	10	3,4 \pm 0,5	5	2,8 \pm 0,1
Палочкоядерные, %	10	1,8 \pm 0,7	5	1,6 \pm 0,5
Сегментоядерные, %	10	21,4 \pm 1,9	5	28,0 \pm 2,8
Моноциты, %	10	0,6 \pm 0,2	5	0,2 \pm 0,2
Эозинофилы, %	10	0,6 \pm 0,2	5	0,8 \pm 0,4
Лимфоциты, %	10	75,6 \pm 3,2	5	69,4 \pm 2,8
РФМК, мг/100мл	7	13,1 \pm 1,5	3	10,0 \pm 1,2
Протромб. время, с	8	11,6 \pm 1,8	2	12,0 \pm 1,5
Фибриноген, г/л	6	41,1 \pm 0,7	4	5,5 \pm 0,8
Тромбоциты, 10 ⁹ /л	10	266,0 \pm 37,0	5	276,0 \pm 48,1

ские клетки с крупными гиперхромными ядрами и розовой цитоплазмой в виде ободка. Ядра принимают неправильные округлые формы, местами 2 – 3-лопастные, расположенные центрально (рис. 1, *C*). В миокарде наблюдается рассеянная и мелкоочаговая лимфоидная инфильтрация (рис. 1, *D*). Существенных изменений в других тканях не обнаружено (рис. 1, *E*, *F*, *G*).

Таким образом, выявленные патоморфологические изменения можно оценить как компенсаторно-приспособительную реакцию в ответ на антигенное воздействие. Для данной экспериментальной группы наиболее характерно развитие выраженной реакции лимфоидной ткани, в частности, селезёнки, которая подчёркивает пик ответа в виде гиперплазии молодых форм.

Для исследования хронической токсичности белым лабораторным крысам наносили ангиогенин 0,01 % в количестве 100 мг препарата на животное на скарифицированную область кожи спины 2 × 3 см ежедневно в течение 1 месяца ($n = 20$ в каждой группе). В результате исследований не зафиксировано никаких существенных изменений интегральных показателей: отсутствовали изменения в поведении животных, во внешнем виде, состоянии шерсти также было нормальным. Не зафиксировано также изменений в ходе наблюдений за динамикой веса животных (табл. 3).

Согласно данным биохимического исследования не зафиксировано каких-либо существенных изменений и различий между группой, получавшей ангиогенин, и контрольной группой (табл. 4).

Согласно данным гематологического исследования не зафиксировано существенных изменений каких-либо показателей, все показатели были в пределах видовой нормы (табл. 5).

Полученные данные свидетельствуют об отсутствии токсического действия ангиогенина на клетки крови и гематологические показатели в условиях эксперимента по хронической токсичности.

При вскрытии животных, умерщвлённых после месячного наблюдения, макроскопические изменения внутренних органов не обнаружены. Все органы были взвешены, оценена их консистенция и цвет. Данные массы органов использовали для расчёта коэффициента отношения массы органов к массе тела (табл. 6). Следует отметить, что статистически достоверных отличий от контроля не наблюдали.

При гистологическом исследовании тканей животных, подвергшихся воздействию ангиогенина, выявлена следующая картина. В подслизистом слое кишечника наблюдалось полнокровие сосудов в группе, получавшей ангиогенин, и в контрольной группе (рис. 2, *A*). Зафиксированы небольшие очаги слущивания эпителия желудка у животных группы, получавшей ангиогенин (рис. 2, *B*). В селезёнке отмечено полнокровие сосудов, редкие области гемосидерина, фолликулы сохранены, присутствовали единичные кровоизлияния (рис. 2, *C*). В печени животных обеих групп также наблюдалось полнокровие сосудов (рис. 2, *D*). Отмечены единичные очаги кровоизлияний в почках у группы, получавшей ангиогенин (рис. 2, *E*). В обеих группах отмечены полная сохранность эпителия пищевода (рис. 2, *F*), отсутствие патологических изменений в яичниках и семенниках (рис. 2, *G*).

В целом морфология внутренних органов животных из эксперимента по хронической токсичности ангиогенина характеризовалась отсутствием дистрофии паренхиматозных органов, небольшими очагами слущивания эпителия желудочно-кишечного тракта, полнокрови-

Таблица 2. Отношение массы органов к массе тела у животных, которым вводили ангиогенин (в мг/кг)

Орган	Все животные	Самки	Самцы	Норм. знач.
Мозг	9,2 ± 0,3	9,9 ± 0,3	8,5 ± 0,3	7,0 – 9,0
Печень	31,2 ± 1,4	33,9 ± 1,3	28,4 ± 1,9	30,0 – 40,0
Почки	5,6 ± 0,2	6,0 ± 0,2	5,2 ± 0,1	5,0 – 8,0
Сердце	3,7 ± 0,2	3,9 ± 0,2	3,4 ± 0,2	3,0 – 4,5
Селезёнка	5,2 ± 0,4	5,6 ± 0,6	4,7 ± 0,5	3,2 – 5,0
Гонады		0,38 ± 0,04	10,8 ± 0,4	0,20 – 0,50/ 9,0 – 15,0
Надпочечники	0,25 ± 0,02	0,28 ± 0,02	0,22 ± 0,02	0,12 – 0,25
Тимус	1,07 ± 0,06	1,07 ± 0,08	1,08 ± 0,09	—
Поджелудочная железа	3,5 ± 0,2	3,7 ± 0,3	3,3 ± 0,2	—

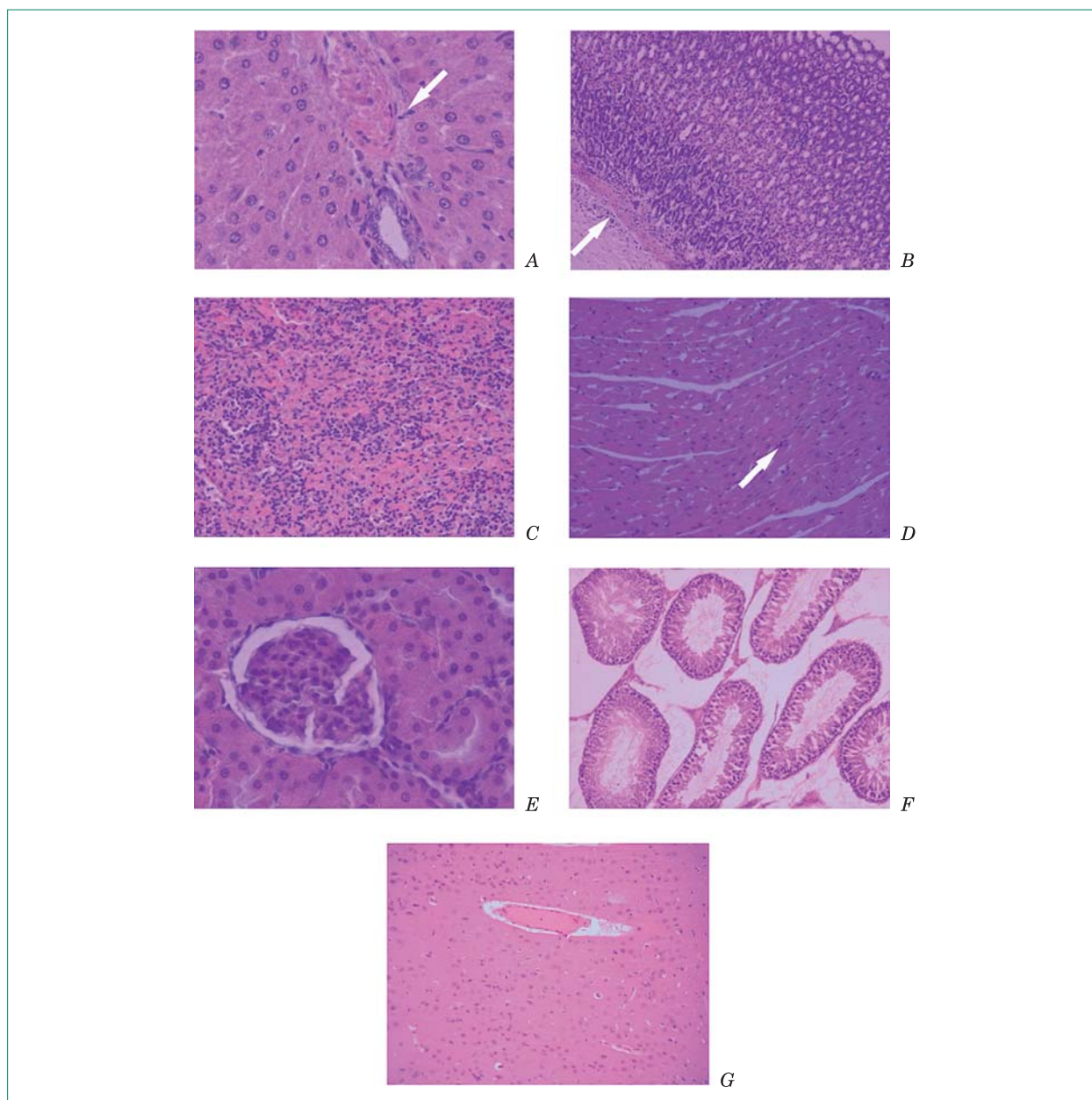


Рис. 1. Гистологическое исследование тканей животных, подвергшихся воздействию ангиогенина при исследовании острой токсичности: *A* — ткань печени, стрелка указывает на мелкоочаговые скопления лимфоцитов, $\times 400$; *B* — ткань кишечника, стрелка указывает на мелкоочаговые скопления лимфоцитов, $\times 200$; *C* — ткань селезенки, $\times 200$; *D* — ткань миокарда, стрелка указывает на мелкий очаг лимфоидной инфильтрации, $\times 400$; *E* — ткань почки, $\times 400$; *F* — ткань семенника, $\times 400$; *G* — ткань головного мозга, $\times 200$, окрашивание гематоксилин-эозином.

ем сосудов и участками кровоизлияний внутренних органов. Данные изменения не являются признаками патологии.

Результаты исследования местно-раздражающего действия показали, что ни в одном случае в группе, получавшей ангиогенин, или в контрольной группе, местно-раздражающее действие не обнаружено.

Исследование аллергизирующих свойств ангиогенина проведено посредством постановки теста кожной анафилаксии на морских свин-

ках. При внутрикожном введении ангиогенин не вызывал гиперемии и отека кожи, которые могли бы свидетельствовать о развитии кожной аллергической реакции. У всех животных отмечена отрицательная реакция на разрешающую дозу препарата. В контрольной группе также отсутствовали какие-либо признаки наличия эритемы/отека.

Исследование реакции гиперчувствительности замедленного типа проведено на белых беспородных мышях. ИР гиперчувствительно-

Таблица 3. Динамика массы лабораторных животных во время эксперимента по хронической токсичности (в г)

Время эксперимента, сут.	Ангиогенин	Контроль
-7	218 ± 5	217 ± 5
0	221 ± 5	224 ± 6
7	227 ± 7	226 ± 6
14	228 ± 6	227 ± 6
21	229 ± 7	235 ± 5
28	234 ± 5	238 ± 7

сти замедленного типа у мышей, сенсибилизированных ранозаживляющим препаратом ангиогенина, составлял 7,2 ± 2,0 % у сенсибилизированных мышей и 8,2 ± 1,2 % в контрольной группе. Величина ИР на тестирующее введение препаратов в опытной группе мышей достоверно не отличалась от показателей контрольных несенсибилизированных животных.

Таблица 4. Данные биохимического исследования лабораторных животных в эксперименте по хронической токсичности

Показатель	Ангиогенин	Контроль
Общий билирубин, мкмоль/л	3,27 ± 0,49	3,59 ± 0,55
Щелочная фосфатаза, нмоль/с/л	1167 ± 59	1149 ± 110
Аланин-трансаминаза, мкмоль/с/л	0,511 ± 0,047	0,476 ± 0,056
Аспартат-трансаминаза, мкмоль/с/л	0,639 ± 0,051	0,655 ± 0,044
Креатинин, мкмоль/л	63,1 ± 5,7	56,8 ± 4,9
Мочевина, ммоль/л	4,81 ± 0,21	5,41 ± 0,64
Глюкоза, ммоль/л	5,21 ± 0,31	4,88 ± 0,42
Общий белок, г/л	70,5 ± 3,2	69,4 ± 2,3

Таблица 6. Соотношение массы органов к массе тела экспериментальных животных в эксперименте по хронической токсичности (в мг/кг)

Орган	Ангиогенин			Контроль			Нормальное значение
	все животные	самки	самцы	все животные	самки	самцы	
Мозг	8,4 ± 0,3	8,9 ± 0,3	7,9 ± 0,3	7,9 ± 0,3	8,6 ± 0,2	7,1 ± 0,2	7,0 – 9,0
Печень	31,0 ± 1,4	33,7 ± 1,7	28,2 ± 1,5	30,6 ± 1,5	34,4 ± 1,1	26,8 ± 1,1	30,0 – 40,0
Почки	6,0 ± 0,3	6,4 ± 0,2	5,6 ± 0,4	5,4 ± 0,2	5,7 ± 0,3	5,1 ± 0,2	5,0 – 8,0
Сердце	4,1 ± 0,2	4,5 ± 0,1	3,6 ± 0,3	3,8 ± 0,2	4,3 ± 0,1	3,4 ± 0,1	3,0 – 4,5
Селезёнка	4,3 ± 0,3	4,4 ± 0,3	4,2 ± 0,6	5,1 ± 0,5	6,4 ± 0,4	3,9 ± 0,5	3,2 – 5,0
Гонады		0,42 ± 0,04	8,7 ± 0,5		0,46 ± 0,06	8,7 ± 0,2	0,2 – 0,5/ 9,0 – 15,0
Надпочечники	0,26 ± 0,02	0,29 ± 0,02	0,24 ± 0,03	0,25 ± 0,02	0,25 ± 0,02	0,25 ± 0,03	0,12 – 0,25
Тимус	1,04 ± 0,06	0,97 ± 0,07	1,11 ± 0,09	0,94 ± 0,07	1,04 ± 0,11	0,84 ± 0,08	—
Поджелудочная железа	3,5 ± 0,2	3,6 ± 0,2	3,4 ± 0,3	3,3 ± 0,2	3,7 ± 0,3	3,0 ± 0,1	—

Таблица 5. Данные гематологического исследования лабораторных животных в эксперименте по хронической токсичности

Показатель	Ангиогенин	Контроль
Гемоглобин, г/л	158 ± 2	161 ± 2
Эритроциты 10 ¹² /л	8,18 ± 0,19	8,13 ± 0,41
Лейкоциты 10 ⁹ /л	7,49 ± 0,21	7,52 ± 0,23
Сегментоядерные, %	19,9 ± 2,5	21,8 ± 1,7
Моноциты, %	4,5 ± 0,9	3,6 ± 0,8
Эозинофилы, %	3,7 ± 0,5	3,0 ± 0,9
Лимфоциты, %	71,9 ± 2,1	71,6 ± 1,6

Таким образом, показано, что препарат ангиогенина не обладает способностью индуцировать развитие реакции гиперчувствительности замедленного типа у мышей. Проведенные исследования индукции аллергических проявлений при использовании препарата ангиогенина свидетельствуют об отсутствии алергизирующих свойств.

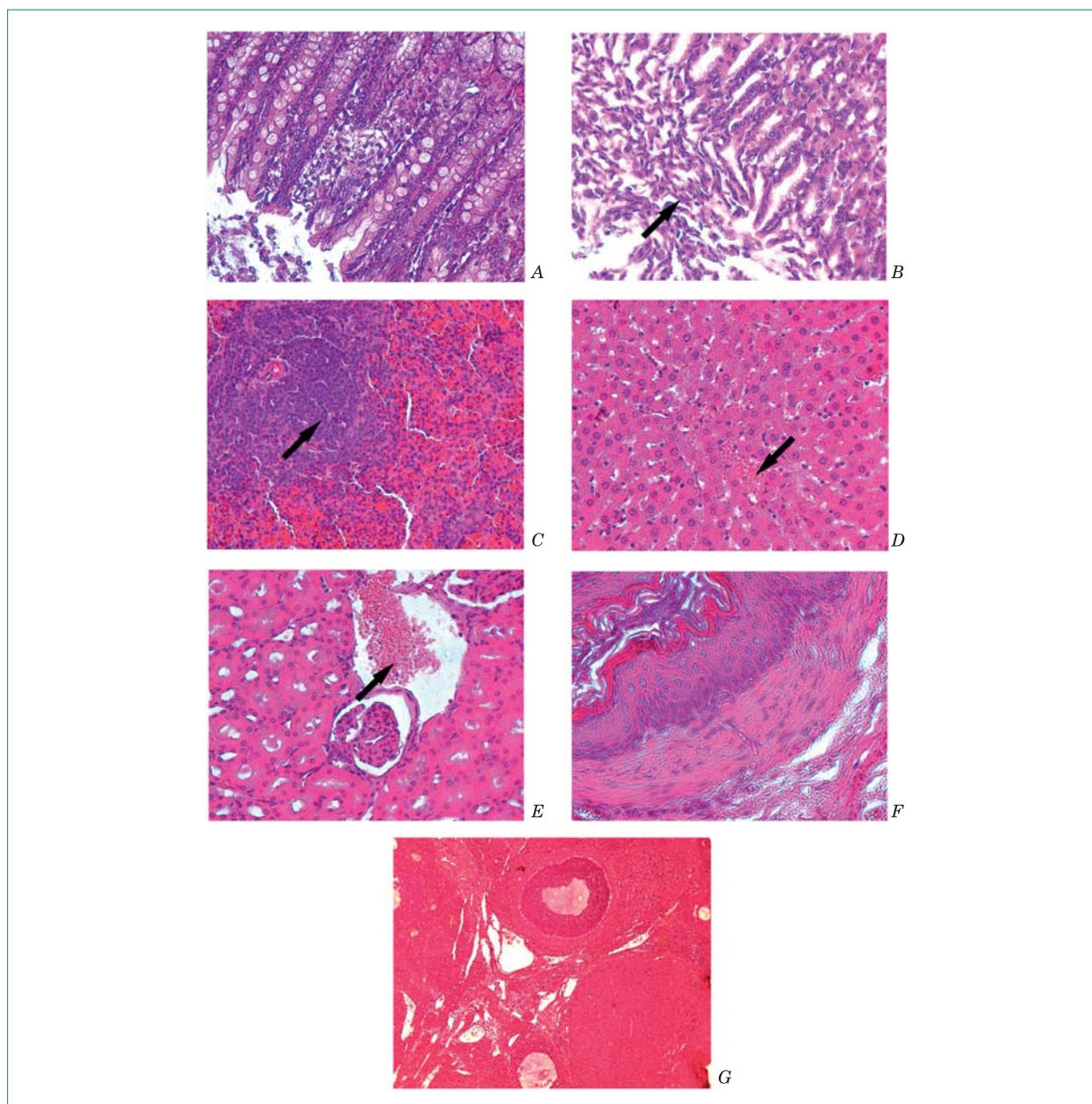


Рис. 2. Гистологическое исследование тканей животных, подвергшихся воздействию ангиогенина при исследовании хронической токсичности: *A* — эпителий кишечника, $\times 200$; *B* — эпителий желудка, стрелка указывает на пласты слизистого эпителия, $\times 200$; *C* — ткань селезёнки, стрелка указывает на лимфоидные фолликулы, $\times 200$; *D* — ткань печени, стрелка указывает на полнокровные синусоиды, $\times 200$; *E* — ткань почек, стрелка указывает на очаг кровоизлияния, $\times 400$; *F* — эпителий пищевода, $\times 200$; *G* — ткань семенников, $\times 400$, окрасивание гематоксилин-эозином.

Иммунотоксичность оценивали при воздействии максимальной технически достижимой дозы для внутрижелудочного введения. Содержание антителообразующих клеток в селезёнке не отличалось между группой, получавшей ангиогенин, и контрольной группой, и составляло $(54 \pm 2) \cdot 10^6$ и $(53 \pm 2) \cdot 10^6$ клеток/орган соответственно. Как следует из данных табл. 7, исследуемый препарат не оказывал статистически значимого влияния на общую клеточность им-

мунокомпетентных органов и число жизнеспособных клеток.

Фагоцитарная активность макрофагов также находилась в пределах нормы. Не зафиксировано статистически значимого снижения фагоцитарной активности ни в индуцированном, ни в спонтанном тесте (табл. 8).

Полученные результаты свидетельствуют об отсутствии иммунотоксических реакций у субстанции ангиогенина.

Таблица 7. Общие клеточность и число жизнеспособных клеток иммунокомпетентных органов (в 10⁶/орган)

Группа	Клеточность	Жизнеспособные клетки
	<i>Селезёнка</i>	
Контроль	217 ± 4	154 ± 5
Ангиогенин	224 ± 5	164 ± 6
	<i>Тимус</i>	
Контроль	67,9 ± 3,0	47,3 ± 3,0
Ангиогенин	66,6 ± 1,8	45,8 ± 1,8
	<i>Костный мозг</i>	
Контроль	214 ± 6	154 ± 6
Ангиогенин	215 ± 6	158 ± 6

Исследование эмбриотоксичности проведено на белых крысах линии Вистар. Во время эксперимента оценивали интегральные показатели состояния животных, в том числе наблюдали за поведением животных, активностью, состоянием шёрстного покрова, а также оценивали массу тела самок крыс во время беременности. Существенных изменений в поведении, активности и общем состоянии животных как контрольной, так и опытной группы, получавшей ангиогенин, не наблюдалось. Статистически достоверных отличий массы тела животных также не зафиксировано.

Таблица 9. Показатели эмбриотоксичности в эксперименте по тестированию ангиогенина

Количество	Контроль		Ангиогенин	
	всего	%	всего	%
Самок крыс, всего	30	100 ¹	30	100 ¹
Крыс с эмбрионами	24	80 % ¹	23	77 ¹
Крыс с обнаруженными местами имплантации и без эмбрионов	4	13 ¹	4	13 ¹
Крыс с жёлтыми телами и без эмбрионов и мест имплантации	0	0 ¹	0	0 ¹
Крыс без жёлтых тел, мест имплантации и эмбрионов	2	7 ¹	3	10 ¹
Эмбрионов, всего	172		169	
Мест имплантации, всего	214		216	
Жёлтых тел, всего	227		230	
Эмбрионов на 1 крысу, включая крыс без эмбрионов	5,73 ± 0,66		5,63 ± 0,67	
Эмбрионов на помёт (на 1 крысу с эмбрионами)	7,17 ± 0,73		7,34 ± 0,77	
Мест имплантации на 1 крысу	7,13 ± 0,52		7,20 ± 0,60	
Жёлтых тел на 1 крысу	7,56 ± 0,56		7,67 ± 0,63	
Постимплантационная гибель	42	19,6 ²	47	21,8 ²
Предимплантационная гибель	13	5,7 ³	13	5,6 ³
Кранио-каудальный размер, мм	3,72 ± 0,02		3,71 ± 0,02	
Масса плода, г	4,31 ± 0,03		4,30 ± 0,03	

Примечание: ¹ — в пересчёте на число крыс, ² — в пересчёте на число мест имплантации, ³ — в пересчёте на число жёлтых тел.

Таблица 8. Данные НСТ-теста на определение фагоцитарной активности в спонтанном и индуцированном вариантах эксперимента

Группа	Спонтанный	Стимулированный
Контроль	4,58 ± 0,15	6,65 ± 0,27
Ангиогенин	4,55 ± 0,20	6,59 ± 0,26

При оценке показателей эмбриотоксичности не выявлено статистически достоверных отличий между группой, получавшей ангиогенин, и контрольной группой (табл. 9).

При макроскопическом осмотре потомства контрольной группы (172 плода) и группы, получавшей ангиогенин (169 плодов), грубых внешних аномалий развития и тератогенного эффекта не обнаружено. Анализ состояния внутренних органов плодов (по методу Вильсона) свидетельствовал об отсутствии достоверных различий в частоте встречаемости патологий внутренних органов эмбрионов (табл. 10).

Анализ состояния окостенения плодов по Доуссону также не выявил статистически значимой разницы между контрольной группой и группой, получавшей ангиогенин (табл. 11).

Таким образом, результаты исследования свидетельствуют об отсутствии статистически значимого эмбриотоксического эффекта воздействия ангиогенина. Количество жизнеспособных эмбрионов, показатели количества мест

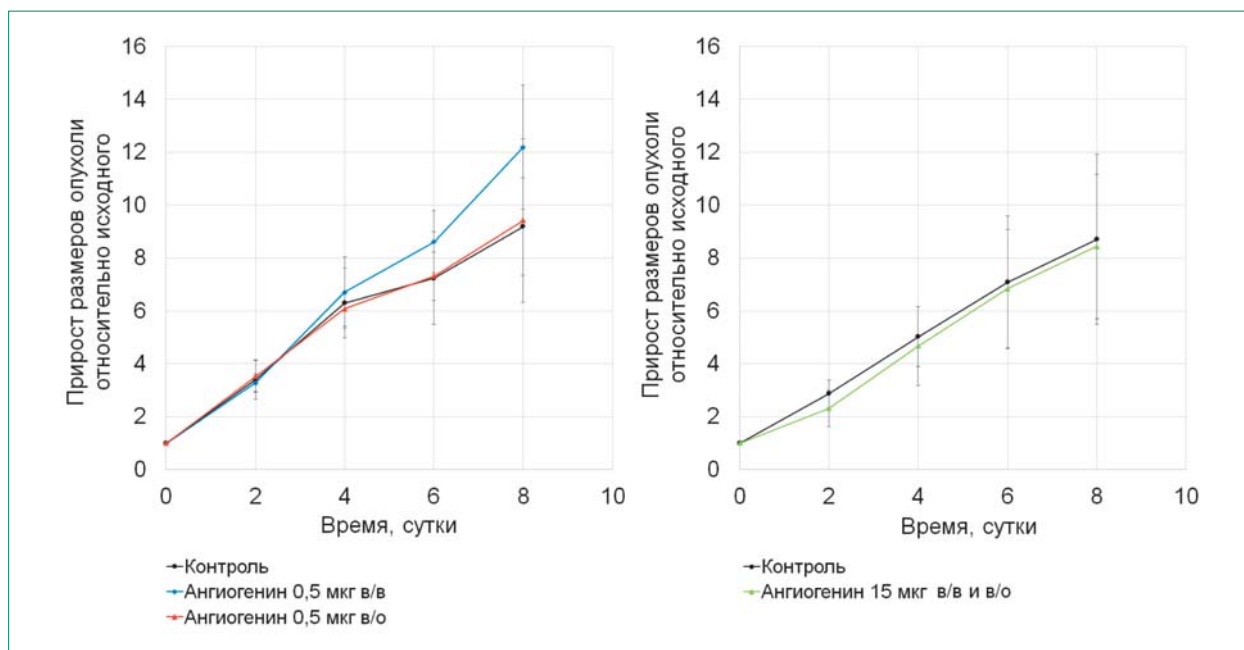


Рис. 3. Динамика роста внутримышечного трансплантата опухоли Кребс-2 при внутривенном (в/в) и/или внутриволевоном (в/о) введении 0,5 или 15 мкг ангиогенина по сравнению с контрольной группой.

имплантации и числа жёлтых тел между группой, получавшей ангиогенин, и контрольной группой не имели статистически значимых отличий. Не зафиксировано различия в среднем кранио-каудальном размере и массе эмбрионов. Частота выявленных пороков развития также достоверно не отличалась.

Мутагенную активность препарата ангиогенина оценивали методом учета способности исследуемой субстанции индуцировать генные мутации у индикаторных микроорганизмов. Установлено, что препарат гелевой формы ангиогенина в исследуемом диапазоне доз (4, 8, 10, 20, 30 и 40 мг/мл) не способствует увеличению числа колоний ревертантов относительно базового уровня спонтанных мутаций. Среднее количество позитивных лунок не отличается от

Таблица 10. Аномалии развития плодов (на 20-е сутки пренатального периода)

Показатель	Контроль		Ангиогенин	
	всего	%	всего	%
Кровоизлияние в брюшную полость	1	0,6	1	0,6
Эктопия почек	2	1,2	3	1,8
Кровоизлияние в перикард	2	1,2	1	0,6
Микроцефалия головного мозга	1	0,6	2	1,2
Всего аномалий	6	3,5	7	4,1

аналогичного значения в негативном контроле. Кратность превышения относительно нулевой линии в исследуемом диапазоне доз препарата гелевой формы ангиогенина составляет менее чем 2,0. Различия между воздействием препарата и контролем были недостоверными ($p > 0,05$).

Таким образом, на основании отрицательного ответа, полученного в тесте Эймса, можно сделать вывод, что препарат гелевой формы ангиогенина в исследованном диапазоне доз от

Таблица 11. Отсутствие центров оксификации как показатель развития костного скелета плодов (на 20-е сутки пренатального периода)

Показатель	Контроль		Ангиогенин	
	всего	%	всего	%
Грудина	1	0,6	0	0
Передняя конечность, всего	4	2,4	6	3,5
2-я пястная кость	2	1,2	2	1,2
3-я пястная кость	2	1,2	2	1,2
4-я пястная кость	0	0	2	1,2
Задняя конечность, всего	4	2,4	3	1,8
2-я плюсневая кость	2	1,2	2	1,2
3-я плюсневая кость	2	1,2	0	0
4-я плюсневая кость	0	0	1	0,6
Лонная кость	1	0,6	2	1,2
Всего	10	5,8	11	6,5

4 до 40 мг/мл в отношении штаммов TA98, TA100, TA1535, TA1537 *S. typhimurium* мутантной активностью не обладает.

Исследование потенциала канцерогенности проведено в экспериментах *in vivo* на мышах линии Balb/c. Установлено, что гель ангиогенина 0,0025 % не обладает аналогичным 9,10-диметилбензантрацену папилломообразующим действием. Установлено, что гель ангиогенина 0,0025 % не приводил к образованию папиллом, тогда как в группе, получавшей 9,10-диметилбензантрацен, на 70-й день опыта образование папиллом наблюдалось у 81 % животных, при этом среднее количество папиллом у одного животного составило 3 шт.

Также оценена стимуляция роста опухоли Кребс-2 у мышей линии СВА при внутривенном и внутриопухолевом введении ангиогенина. Достоверных различий в росте опухоли между экспериментальными группами и контролем не наблюдалось (рис. 3). Инъекции ангиогенина в дозе 0,5 – 15 мкг/мышь ежедневно в течение 10 суток достоверно не влияли на рост солидных опухолей Кребс-2.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Оценена острая и хроническая токсичность препаратов на основе ангиогенина. Ангиогенин не проявил токсичных свойств, животные успешно перенесли максимально достижимую дозу при внутрижелудочном введении. По параметрам острой токсичности, согласно классификации ГОСТ 12 1 007–76 препарат при введении в желудок или при нанесении на кожу относится к 4 классу малоопасных веществ. Местно-раздражающие, кожно-резорбтивные и сенсибилизирующие свойства в рекомендованных режимах применения не выражены. Аллергенность, иммунотоксичность и эмбриотоксичность в пренатальном периоде развития не выявлены. Максимальная длительность наблюдений во время проведения исследований составила 1 месяц.

Работа выполнена при поддержке бюджетного финансирования по теме государственного задания № FWNR-2022-0016 и при поддержке ООО «Лаборатория Ангиофарм».

СПИСОК ССЫЛОК

1. Koutroubakis I. E., Xidakis C., Karmiris K., Sfiridakis A., Kandidaki E., Kouroumalis E. A. / Dig. Dis. Sci. 2004. V. 49. No. 11 – 12. P. 1758 – 1762.
2. King T. V., Vallee B. L. / J. Bone Joint Surg. Br. 1991. V. 73. No. 4. P. 587 – 590.
3. Goncalves K. A., Silberstein L., Li S., Severe N., Hu M. G., Yang H., Scadden D. T., Hu G. / Cell. 2016. V. 166. No. 4. P. 894 – 906.
4. Yu D., Cai Y., Zhou W., Sheng J., Xu Z. / Disease Markers. 2018. <https://doi.org/10.1155/2018/1984718>
5. Kishimoto K., Liu S., Tsuji T., Olson K. A., Hu G. / Oncogene. 2005. V. 24. No. 3. P. 445 – 456.
6. Hu G. F. et al. An angiogenin-binding protein from endothelial cells / Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1991. V. 88. No. 6. P. 2227 – 2231.
7. Hu G. F., Chang S. I., Riordan J. F., Vallee B. L. / Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1993. V. 90. No. 4. P. 1217 – 1221.
8. Hu G. F., Riordan J. F., Vallee B. L. Angiogenin promotes invasiveness of cultured endothelial cells by stimulation of cell-associated proteolytic activities / Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1994. V. 91. No. 25. P. 12096 – 12100.
9. Tsuji T., Sun Y., Kishimoto K., Olson K. A., Liu S., Hirukawa S., Hu G. / Cancer Res. 2005. V. 65. No. 4. P. 1352 – 1360.
10. Wei S., Gao X., Du J., Su J., Xu Z. / PLoS One. 2011. V. 6. No. 12. e28797.
11. Moroiaru J., Riordan J. F. Nuclear translocation of angiogenin in proliferating endothelial cells is essential to its angiogenic activity / Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1994. V. 91. No. 5. P. 1677 – 1681.
12. Pizzo E., Sarcinelli C., Sheng J., Fusco S., Formigini F., Netti P., Yu W., D'Alessio G., Hu G. / J. Cell Sci. 2013. V. 126. No. 18. P. 4308 – 4319.
13. Hoang T. T., Raines R. T. Molecular basis for the autonomous promotion of cell proliferation by angiogenin / Nucleic Acids Res. 2017. V. 45. No. 2. P. 818 – 831.
14. Prehn J. H. M., Jirstrom E. Angiogenin and tRNA fragments in Parkinson's disease and neurodegeneration / Acta Pharmacol. Sin. 2020. V. 41. No. 4. P. 442 – 446.
15. Sheng J., Xu Z. Three decades of research on angiogenin: A review and perspective / Acta Biochim. Biophys. Sin. 2016. V. 48. No. 5. P. 399 – 410.
16. Yu W., Goncalves K. A., Kishikawa H., Li S., Sun G., Yang H., Vanli N., Wu Y., Jiang Y., Hu M. G., Friedel R. H., Hu G. / Cell. 2017. V. 171. No. 4. P. 849 – 864.e25.
17. Thomas S. P., Hoang T. T., Ressler V. T., Raines R. T. Human angiogenin is a potent cytotoxin in the absence of ribonuclease inhibitor / RNA. 2018. V. 24. No. 8. P. 1018 – 1027.
18. Emara M. M., Ivanov P., Hickman T., Dawra N., Tisdale S., Kedersha N., Hu G., Anderson P. / J. Biol. Chem. 2010. V. 285. No. 14. P. 10959 – 10968.
19. Ivanov P., Emara M. M., Villen J., Gygi S. P., Anderson P. / Mol. Cell. 2011. V. 43. No. 4. P. 613 – 623.
20. Ivanov P., O'Day E., Emara M. M., Anderson P. / Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2014. V. 111. No. 51. P. 18201 – 18206.
21. Lyons S. M., Fay M. M., Akiyama Y., Anderson P. J., Ivanov P. / RNA Biol. 2017. V. 14. No. 2. P. 171 – 178.
22. Lyons S. M., Achorn C., Kedersha N. L., Anderson P. J., Ivanov P. / Nucleic Acids Res. 2016. V. 44. No. 14. P. 6949 – 6960.

23. Deng J., Ptashkin R. N., Chen Y., Cheng Z., Liu G., Phan T., Deng X., Zhou J., Lee Y. S., Bao X. / *Mol. Ther.* 2015. V. 23. No. 10. P. 1622 – 1629.
24. Yamasaki S., Ivanov P., Hu G., Anderson P. / *J. Cell Biol.* 2009. V. 185. No. 1. P. 35 – 42.
25. Soncin F. Angiogenin supports endothelial and fibroblast cell adhesion / *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1992. V. 89. No. 6. P. 2232 – 2236.
26. Newman A. C., Nakatsu M. N., Chou W., Gershon P. D., Hughes C. C. W. / *Mol. Biol. Cell.* 2011. V. 22. No. 20. P. 3791 – 3800.
27. Lee S. H., Kim K. W., Joo K., Kim J. C. / *BMC Ophthalmol.* 2016. V. 16. P. 57.
28. Hartmann A., Kunz M., Kostlin S., Gillitzer R., Toksoy A., Brocker E. B., Klein C. E. / *Cancer Res.* 1999. V. 59. No. 7. P. 1578 – 1583.
29. Oikonomou K. A., Kapsoritakis A. N., Kapsoritaki A. I., Manolakis A. C., Tiaka E. K., Tsiopoulos F. D., Tsiompanidis I. A., Potamianos S. P. / *Inflamm. Bowel Dis.* 2011. V. 17. No. 4. P. 963 – 970.
30. Etoh T., Shibuta K., Barnard G. F., Kitano S., Mori M. / *Clin. Cancer Res.* 2000. V. 6. No. 9. P. 3545 – 3551.
31. Tschesche H., Kopp C., Horl W. H., Hempelmann U. / *J. Biol. Chem.* 1994. V. 269. No. 48. P. 30274 – 30280.
32. Schmaldienst S., Oberpichler A., Tschesche H., Horl W. H. / *Kidney Blood Press. Res.* 2003. V. 26. No. 2. P. 107 – 112.
33. Matousek J., Soucek J., Riha J., Zankel T. R., Benner S. A. / *Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol.* 1995. V. 112. No. 2. P. 235 – 241.
34. Srivastava M., Zurakowski D., Cheifetz P., Leichter A., Bousvaros A. / *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 2001. V. 33. No. 5. P. 548 – 553.
35. Горячкин А. М., Сысолятин П. Г., Черданцева Л. А., Потапова О. В., Беклемишев А. В., Байдик О. Д. / *Стоматология.* 2019. Т. 1. С. 34 – 37.
36. Гуляев А. Е., Лохвицкий С. В., Тусупханов Б. А. / *Мед. и экол.* 2010. Т. 3. С. 9 – 12.
37. Пуртов А. А., Мамаев А. Л. Рекомбинантная плазмида для экспрессии в дрожжах *Pichia pastoris* гена химерного белка ангиогенина человека и штамм дрожжей *Pichia pastoris* — продуцент рекомбинантного химерного белка ангиогенина человека. Патент Российской Федерации RU2658758C1. 2018.
38. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ / Под ред. Фисенко В. П. — М., 2000. — 398 с.

INVESTIGATION OF GENERAL AND SPECIFIC TOXICITY OF RECOMBINANT HUMAN ANGIOGENIN

A. E. Gulyayev¹, Z. T. Shulgau¹, Sh. D. Sergazy², N. V. Yurina³, A. M. Goryachkin⁴, S. S. Bogachev⁵, A. S. Proskurina^{5,6}

¹ National Center for Biotechnology, 13/5 Kurgalzhynskoye road, Nur-Sultan, 010000, Kazakhstan

² National Laboratory Astana, Nazarbayev University, 53 Kabanbay batyr Ave., Nur-Sultan, 010000, Kazakhstan

³ Autonomous Non-Profit Organization «Regional Center for High Medical Technologies», 71/1 Frunze st., Novosibirsk, 630112, Russia

⁴ Novosibirsk State Medical University, 52 Krasnyj ave., Novosibirsk, 630091, Russia

⁵ Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, 10 Lavrentiev ave., Novosibirsk, 630090, Russia

⁶ labmolbiol@mail.ru

Angiogenin exerted no toxic effects in acute toxicity tests, all animals successfully endured the maximally attainable dose 12 g/kg intragastrically. To assess the long-term/chronic toxicity, the gel-based composition containing 0.01 % of angiogenin was daily applied to the scarified skin areas of rats for 1 month. No significant changes or differences between the treated and control groups were detected by common biochemical, hematological and histological assays. No local irritating effects of 0.0025 % angiogenin gel were detected in appropriate tests using outbred chinchilla rabbits. Angiogenin did not cause neither sensibilization of guinea pigs in active cutaneous anaphylaxis test nor delayed hypersensitivity reaction in mice. No detectable immuno- and embryotoxicity of the preparation were observed. Angiogenin was proved to lack mutagenic and carcinogenic capabilities, as well as the capability of stimulating the tumor growth upon intratumoral administration. The tested preparation of angiogenin showed no toxic effects, including systemic, local irritating, sensibilizing and skin-resorptive ones, and, thus, recombinant human angiogenin is a safe pharmacological substance.

Keywords: acute toxicity, long-term/chronic toxicity, immunotoxicity, embryotoxicity, mutagenic capabilities.