

ДЕРЖАВНЕ
ПАТЕНТНЕ
ВІДОМСТВООПИС ДО ПАТЕНТУ
НА ВИНАХІД

(54) БІОЛОГІЧНО АКТИВНИЙ ЗАСІБ, ЩО МАЄ ІМУНОМОДУЛЮЮЧУ ВЛАСТИВІСТЬ, СПОСІБ ЙОГО ОДЕРЖАННЯ, ПРЕПАРАТ НА ЙОГО ОСНОВІ ТА СПОСІБ НОРМАЛІЗАЦІЇ ФІЗІОЛОГІЧНОГО СТАНУ ОРГАНІЗМУ ЛЮДИНИ ТА ТВАРИН ПРИ ЗАХВОРЮВАННЯХ, ЩО ВИКЛИКАНІ ПЕРЕВАЖНО ФУНКЦІОНАЛЬНОЮ НЕДОСТАТНІСТЮ ОРГАНІВ І ТКАНИН, З ВИКОРИСТАННЯМ ТАКОГО ПРЕПАРАТУ

1

- (21) 93030289
(22) 17.12.92
(24) 30.12.93
(31) 5055549
(32) 21.07.92
(33) RU
(46) 26.12.94. Бюл. № 5-1
(56) 1. FR-A-2413912.
2. US-A-4455302.
3. SU-A-1412596.
4. EP-A-0106285.
5. EP-A-0157427.
6. EP-A-0318030 (прототип).
7. SU-A-904707 (прототип).

(72) Ніколаєнко Олександр Миколаєвич

(73) Ніколаєнко Олександр Миколаєвич

(57) 1. Биологически активное средство, обладающее иммуномодулирующим свойством, на основе органических соединений компонентов клеточных мембран гомогенизированной животной ткани, отличающееся тем, что оно содержит модифицированные компоненты клеточных мембран с антигенной структурой, модифицированной при процессах эмбриогенеза и/или пролиферации, и/или дифференцировки клеток, и/или патологии, предшествовавшей и/или сопутствовавшей регенерации и/или репарации ткани.

2. Средство по п. 1, отличающееся тем, что оно содержит модифицированные компоненты плазматических клеточных мембран с антигенной структурой, модифицированной при процессах эмбриогенеза и/или пролиферации, и/или дифференцировки клеток, и/или патологии, предшествовавшей и/или сопутствовавшей регенерации и/или репарации ткани.

2

3. Средство по п. 1, отличающееся тем, что оно содержит модифицированные компоненты клеточных мембран, термостабильные при температуре $T_n \leq 120^\circ\text{C}$.

4. Средство по п. 2, отличающееся тем, что содержит модифицированные компоненты плазматических клеточных мембран, термостабильные при температуре $T_n \leq 120^\circ\text{C}$.

5. Средство по п. 1, отличающееся тем, что оно содержит низкомолекулярные модифицированные компоненты клеточных мембран с молекулярной массой $M=0,8-10,0$ кДа.

6. Средство по п. 2, отличающееся тем, что оно содержит низкомолекулярные модифицированные компоненты плазматических клеточных мембран с молекулярной массой $M=0,8-10,0$ кДа.

7. Средство по п. 3, отличающееся тем, что оно содержит низкомолекулярные модифицированные компоненты клеточных мембран с молекулярной массой $M=0,8-10,0$ кДа.

8. Средство по п. 4, отличающееся тем, что оно содержит низкомолекулярные модифицированные компоненты плазматических клеточных мембран с молекулярной массой $M=0,8-10,0$ кДа.

9. Средство по п. 5, отличающееся тем, что оно содержит углеводсодержащие модифицированные компоненты клеточных мембран.

10. Средство по п. 6, отличающееся тем, что оно содержит углеводсодержащие модифицированные компоненты плазматических клеточных мембран.

11. Средство по п. 7, отличающееся тем, что оно содержит углеводсодержащие

модифицированные компоненты клеточных мембран.

12. Средство по п.п. 1 или 2, или 3, или 4 или 5, или 6, или 7, или 8, или 9, или 10, или 11, отличающееся с тем, что оно содержит органические соединения в следующем соотношении, мас. %:

Пептиды	28,0-60,0
Аминокислоты	0,5-31,5
Углеводы	16,0-70,0
Липиды, нуклеотиды и другие органические соединения	0,5-17,0

13. Средство по п. 12, отличающееся с тем, что оно содержит углеводы в составе органических соединений в следующем соотношении, мас. % в составе:

Высокомолекулярных соединений, имеющих молекулярную массу $M_{\text{ув}} > 10,0$ кДа	до 3,0
Низкомолекулярных соединений, имеющих молекулярную массу $M_{\text{ун}} = 0,8-10,0$ кДа	11,5-57,9
Свободных мономеров $M_{\text{ум}} < 8$ кДа	3,5-17,0

14. Средство по п.п. 1 или 2, или 3, или 4 или 5, или 6, или 7, или 8, или 9, или 10, или 11, отличающееся с тем, что соотношение массовых содержаний углеводов и пептидов в составе органических соединений с молекулярной массой $M = 0,8-10,0$ кДа лежит в пределах $G=0,6-2,0$.

15. Средство по п.п. 1 или 2, или 3, или 4, или 5, или 6, или 9, или 10, отличающееся с тем, что оно содержит органические соединения в следующем соотношении, мас. %:

Пептиды	40,0-60,0
Аминокислоты	12,9-17,1
Углеводы	16,0-32,8
Липиды, нуклеотиды и другие органические соединения	4,4-10,6

16. Средство по п.п. 3, или 4, или 7, или 8, или 11, отличающееся с тем, что оно содержит органические соединения в следующем соотношении, мас. %:

Пептиды	34,0-50,1
Аминокислоты	16,6-22,6
Углеводы	22,7-34,2
Липиды, нуклеотиды и другие органические соединения	5,4-10,6

17. Средство по п.п. 5 или 6, или 7, или 8, или 9, или 10, или 11, отличающееся с тем, что оно содержит органические соединения в следующем соотношении, мас. %:

Пептиды	28,0-33,6
Аминокислоты	16,5-31,5

Углеводы 26,9-37,9

Липиды, нуклеотиды и другие органические соединения 8,6-17,0

18. Средство по п.п. 9 или 10, или 11, отличающееся с тем, что оно содержит органические соединения в следующем соотношении, мас. %:

Пептиды	29,0-36,3
Аминокислоты	менее 0,5
Углеводы	57,7-70,0
Липиды, нуклеотиды и другие органические соединения	0,5-5,5

19. Способ получения биологически активного средства, обладающего иммуномодулирующим свойством, при котором сырье из животной ткани измельчают и гомогенизируют, а из гомогената выделяют содержащий клеточные мембранные осадок, из которого после ресуспендирования получают компоненты клеточных мембран, отличающийся с тем, что в качестве сырья используют животную ткань, модифицированную при процессах эмбриогенеза и/или пролиферации, и/или дифференцировки клеток, и/или патологии, предшествовавшей и/или сопутствовавшей регенерации и/или репарации ткани, гомогенат которой очищают от неразрушенных элементов ткани путем фильтрации и/или центрифугирования при ускорении 150-250 g в течение 10-15 мин и выделяют осадок, содержащий клеточные мембраны, который подвергают гидролизу, продукты гидролиза фильтруют и/или центрифугируют при ускорении свыше 1 500 g в течение 20-40 минут с выделением супернатанта продуктов гидролиза, содержащих компоненты клеточных мембран в качестве целевого продукта.

20. Способ по п. 19, отличающийся с тем, что в качестве сырья используют эмбриональную ткань, дифференцирующуюся ткань тимоцитов тимуса, сперматогонии и сперматозоиды семенников, плацентарную ткань, эпителиальную ткань кишечника, клетки костного мозга, регенерирующую кожную ткань, ткань регенерирующей печени, ткань регенерирующих конечностей земноводных, патологически измененную ткань, взятую до стадии регенерации.

21. Способ по п. 19, отличающийся с тем, что осадок, содержащий клеточные мембраны, выделяют из очищенного гомогената центрифугированием при ускорении 1 500-90 000 g и/или фильтрацией через фильтр с характерным размером пор $F < 1$ мкм с последующей промывкой путем ресуспендирования и повторного центрифугирования и/или фильтрации до

получения осадка, содержащего клеточные мембраны в количестве не менее 60 мас. % от представленных в осадке органических соединений.

22. Способ по п. 21, отличающийся тем, что полученный осадок, содержащий клеточные мембраны, перед гидролизом дополнительно центрифугируют при ускорении 20 000-100 000 g в градиенте плотности в течение 1-2 часов с выделением плазматических клеточных мембран.

23. Способ по п. 19, отличающийся тем, что гидролиз проводят при температуре $T_p=4-45^\circ\text{C}$.

24. Способ по п. 19, отличающийся тем, что гидролиз проводят в присутствии консерванта.

25. Способ по п.п. 19 или 20, или 21, или 22, или 23, или 24, отличающийся тем, что супернатант продуктов гидролиза, содержащих компоненты клеточных мембран, подвергают термообработке при температуре $T_n=60-120^\circ\text{C}$ до полной денатурации термолabile соединений и дополнительным фильтрованием и/или центрифугированием с ускорением свыше 1 500 g в течение 20-40 минут выделяют супернатант, содержащий термостабильные компоненты клеточных мембран, в качестве целевого продукта.

26. Способ по п.п. 19 или 20, или 21, или 22, или 23, или 24, отличающийся тем, что продукты гидролиза, содержащие компоненты клеточных мембран, перед фильтрацией и/или центрифугированием подвергают термообработке при температуре $T_n=60-120^\circ\text{C}$ до полной денатурации термолabile соединений.

27. Способ по п.п. 19 или 20, или 21, или 22, или 23, или 24, отличающийся тем, что супернатант продуктов гидролиза, содержащих компоненты клеточных мембран, подвергают фракционированию путем диализа через полупроницаемую пленку и/или ультрафильтрации, и/или гельфильтрации с выделением фракции, содержащей низкомолекулярные компоненты с молекулярной массой $M \leq 10,0$ кДа, в качестве целевого продукта.

28. Способ по п.п. 19, или 20, или 21, или 22, или 23, или 24, отличающийся тем, что продукты гидролиза, содержащие компоненты клеточных мембран, подвергают фракционированию путем диализа через полупроницаемую пленку, и/или ультрафильтрации, и/или гельфильтрации с выделением фракции, содержащей низкомолекулярные компоненты с молекулярной массой $M \leq 10,0$ кДа, в качестве целевого продукта.

29. Способ по п. 25, отличающийся тем, что супернатант продуктов гидролиза, содержащих компоненты клеточных мембран, подвергают фракционированию путем диализа через полупроницаемую пленку и/или ультрафильтрации, и/или гельфильтрации с выделением фракции, содержащей низкомолекулярные компоненты с молекулярной массой $M \leq 10,0$ кДа, в качестве целевого продукта.

30. Способ по п. 27, отличающийся тем, что низкомолекулярную фракцию продуктов гидролиза, содержащую компоненты клеточных мембран подвергают аффинной хроматографии на лектинах с выделением фракции, содержащей углеводсодержащие компоненты, в качестве целевого продукта.

31. Способ по п. 29, отличающийся тем, что низкомолекулярную фракцию продуктов гидролиза, содержащую компоненты клеточных мембран подвергают аффинной хроматографии на лектинах с выделением фракции, содержащей углеводсодержащие компоненты, в качестве целевого продукта.

32. Препарат для нормализации физиологического состояния организма человека и животных, содержащий биологически активное средство на основе представленных органическими соединениями компонентов клеточных мембран животной ткани, и наполнитель, отличающийся тем, что в качестве биологически активного средства он содержит в своем составе модифицированные компоненты клеточных мембран с антигенной структурой, модифицированной при процессах эмбриогенеза и/или пролиферации, и/или дифференцировки клеток, и/или патологии, предшествовавшей и/или сопутствовавшей регенерации и/или репарации ткани, при его содержании в препарате 0,001-85,0 мас. %, остальное — наполнитель.

33. Препарат по п. 32, отличающийся тем, что биологически активное средство содержит органические соединения в соотношении, мас. %:

Пептиды	28,0-60,0
Аминокислоты	0,5-31,5
Углеводы	16,0-70,0
Липиды, нуклеотиды и другие органические соединения	0,5-17,0

34. Препарат по п. 33, отличающийся тем, что биологически активное средство содержит органические соединения в соотношении, мас. %:

Пептиды	40,0-60,0
Аминокислоты	12,9-17,1

Углеводы	16,0-32,8
Липиды, нуклеотиды и другие органические соединения	4,4-10,6

35. Препарат по п. 33, отличающийся тем, что биологически активное средство содержит органические соединения в соотношении, мас. %:

* Пептиды	34,0-50,1
Аминокислоты	16,6-22,6
Углеводы	22,7-34,2
Липиды, нуклеотиды и другие органические соединения	5,4-10,6

36. Препарат по п. 33, отличающийся тем, что биологически активное средство содержит органические соединения в соотношении, мас. %:

Пептиды	28,0-33,6
Аминокислоты	16,5-31,5
Углеводы	26,9-37,9
Липиды, нуклеотиды и другие органические соединения	8,6-17,0

37. Препарат по п. 33, отличающийся тем, что биологически активное средство содержит органические соединения в соотношении, мас. %:

Пептиды	29,0-36,3
Аминокислоты	менее 0,5
Углеводы	57,7-70,0
Липиды, нуклеотиды и другие органические соединения	0,5-5,5

38. Препарат по п.п. 33, или 34, или 35, или 36, или 37, отличающийся тем, что в качестве наполнителя содержит физиологический раствор натрия хлористого и/или солевой буферный раствор, и/или углеводные соединения, и/или жиры минерального, животного, растительного или синтетического происхождения и их смеси.

39. Препарат по п.п 33, или 34, или 35, или 36, или 37, отличающийся тем, что он дополнительно содержит консервант.

40. Способ нормализации физиологического состояния человека и животных при заболеваниях, вызванных преимущественно функциональной недостаточностью органов и тканей, предусматривающий введение в организм препарата на основе органических соединений компонентов клеточных мембран животной ткани, отличающийся тем, что в качестве препарата используют композицию из 0,001-85,0 мас. % биологически активного средства, содержащего в своем составе модифицированные компоненты клеточных мембран с антигенной структурой, модифицированной при процессах эмбриогенеза и/или пролиферации, и/или дифференцировки клеток, и/или патологии, предшествовавшей и/или сопутствовавшей регенерации и/или репарации ткани, и 15,0-99,999 мас % наполнителя, а введение препарата в организм осуществляют путем внутримышечных инъекций в дозе 0,005-0,5 мг упомянутого средства на кг массы тела с интервалом между инъекциями 1-7 дней и/или ингаляций в дозе 0,012-0,12 мг средства на кг массы тела с интервалом между ингаляциями 4-48 часов, и/или сублингвального введения в дозе 0,012-0,12 мг средства на кг массы тела с интервалом между введениями 4-48 часов, и/или выпаивания в дозе 0,02-1,0 мг средства на кг массы тела с интервалом между выпаиваниями 1-10 дней и/или интального введения в пилюлях в дозе 0,02-1,0 мг средства на кг массы тела с интервалом между введениями 1-10 дней, и/или интраназального введения в суточной дозе 0,001-0,05 мг средства на кг массы тела с интервалом между введениями 2-24 часа, и/или аппликации на слизистую или раневую поверхность в виде компрессов, свечей, присыпок, мазей и гелей с интервалами между применениями 1-10 дней, — до нормализации параметров физиологического состояния.

Группа изобретений относится к химико-фармацевтической промышленности, а именно к области получения биологически активных средств, обладающих иммуномодулирующим действием, для использования в медицине и ветеринарии с целью нормализации физиологического состояния организма человека и животных, в частности, для восстановления функциональной активности органов и тканей.

Биологически активное средство, в соответствии с настоящим изобретением, относится к веществам животного происхождения и включает в себя органические соединения

Различного рода патологические нарушения в организме человека и животных вызывают отклонения от нормы параметров физиологического состояния. В этих случаях лечебное воздействие на организм, в том

числе профилактическое воздействие, заключается в стабилизации, то есть поддержании в норме, указанных параметров, либо (при отклонениях их от нормы) в таком воздействии на организм, при котором эти параметры нормализуются.

Нормализацию физиологического состояния организма человека и животных можно осуществлять по двум направлениям: во-первых путем непосредственного воздействия на патологию и, во-вторых, путем опосредованного воздействия на системы, органы и ткани организма, отвечающие за поддержание в норме параметров гомеостаза.

Введение гормональных препаратов, медиаторов, ростовых факторов, химиотерапия и тому подобные средства обеспечивают непосредственное воздействие на клетки-мишени путем рецепции. Например, при лечении диабета вводят инсулин, восполняющий функциональный недостаток поджелудочной железы; при нарушениях функциональной активности нервной системы вводят нейромедиаторы, способствующие нормализации пороговой чувствительности нейронов и, соответственно, улучшению передачи нервных импульсов; при нарушениях функциональной активности иммунной системы организма используют иммуномедиаторы, коррелирующие иммунный ответ, и так далее.

При опосредованном воздействии на организм лечение заболеваний обеспечивается за счет мобилизации внутренних ресурсов организма. Так, при протекании процессов, связанных с регенерацией органов и тканей, с их реабилитацией или восстановлением их функций, а также при воспалительных и инфекционных процессах стимулируют иммунную систему организма. Благодаря этому обеспечивают улучшение иммунологического и, как следствие, общего состояния организма.

Известно биологически активное средство на основе зародышевой ткани, обладающее иммуномодулирующим свойством, восстанавливающее физиологическое состояние организма и регулирующее обмен клеток [1]. Указанное биологически активное средство (далее по тексту - БАС) выполнено на основе ингредиентов измельченной и гомогенизированной животной ткани, выделенной из зародыша, в смеси с физиологической сывороткой.

Вследствие наличия в составе данного средства иммуномодулирующего фактора оно обладает сравнительно высоким иммуномодулирующим свойством, благодаря чему его использование обеспечивает

нормализацию физиологического состояния организма, в том числе лечение, и повышение продуктивности животных на 5-15% по сравнению с контрольной группой.

Эффективность известного БАС все же недостаточна вследствие того, что наряду с иммуномодулирующими факторами оно содержит в своем составе иммунодепрессанты, которые препятствуют полному проявлению иммуномодулирующего эффекта. Иммуномодулирующее свойство указанного средства, по сути дела, является суммарным результатом, который обеспечивается одновременным присутствием в нем иммуностимулирующих факторов и депрессантов. Таким образом, фактически специфическая активность известного БАС, зависящая от соотношений концентраций иммуностимулирующих факторов и депрессантов, сравнительно невелика вследствие значительной концентрации депрессантов в его составе.

Другим недостатком указанного БАС является повышенное содержание в его составе высокомолекулярных соединений, являющихся иммуногенами, приводящее к появлению побочных иммунных реакций (аллергия, гиперчувствительность замедленного типа и тому подобное).

В значительной степени недостатки вышеописанного БАС зависят от способа его получения, в котором технологический процесс заканчивается операций измельчения и гомогенизации сырья и животной ткани, что приводит к обязательному присутствию значительного количества депрессантов и высокомолекулярных соединений в его составе.

Известно также БАС, обладающее иммуномодулирующим свойством, для нормализации физиологического состояния организма, выполненное на основе продуктов гидролиза ингредиентов измельченного сырья животного происхождения, взятого предпочтительно от недоразвитых животных, способы его получения и применения для заживления травмированных участков тела [2]. В его состав входят растворимые полипептиды, аминокислоты и минеральные вещества, полученные в результате гидролиза ткани.

Данное БАС обладает высокой эффективностью в отношении нормализации параметров физиологического состояния организма. Это объясняется тем, что известное БАС характеризуется высоким соотношением эффектов иммуностимуляции и иммуноингибирования, с одной стороны, в связи с более высоким содержанием в его составе иммуностимулирующих факторов за

счет присутствия продуктов гидролиза, а с другой, в связи со значительным уменьшением количества высокомолекулярных соединений в ходе того же процесса гидролиза.

Однако эффективность известного БАС все же недостаточна, из-за содержания в его составе относительно большого количества балластных веществ и иммунодепрессантов. Кроме того, известное БАС также может вызывать побочные эффекты, проявляющиеся при его использовании (аллергия и другие) вследствие того, что в его составе также присутствуют высокомолекулярные соединения, которые являются иммуногенами и молекулярная масса которых превышает 10,0 кДа.

Недостатком известного БАС является и то, что состав получаемого целевого продукта непостоянен и колеблется от партии к партии, вследствие чего затруднена его стандартизация.

Свойства известного БАС, прежде всего его иммуномодулирующая активность прямо связаны со способом его получения, который включает гидролиз ингредиентов промытого измельченного сырья животного происхождения, центрифугирование гидролизата, фильтрацию и выделение целевого продукта, причем гидролиз проводят в растворе разбавленной слабой органической кислоты при pH 3,6-6,5 и температуре около 68°C, а в качестве сырья используют ноги недоразвитой домашней птицы не более, чем 9-недельного возраста.

Целевой продукт выделяют в виде порошка или геля, который при использовании накладывают на поврежденные участки тела.

Использование в качестве сырья животной ткани, содержащей в своем составе сравнительно большое количество иммунодепрессантов и невозможность улучшить состав целевого продукта с помощью выполняемых в известном способе операций, существенно снижает эффективность получаемого БАС.

Следует учитывать, что содержащиеся в тканевых препаратах компоненты экстракта в значительной степени являются стимуляторами функциональной активности органов и тканей, воздействие которых в основном является односторонним, то есть действие БАС зависит лишь от его концентрации в организме и не зависит от физиологического статуса организма. Это требует строгого соблюдения дозировок лекарственного препарата на основе известного БАС в процессе лечения.

Указанные недостатки частично устранены в известных БАС, эффект воздействия

которых коррелирует с физиологическим статусом организма и в случае его нормализации действие такого БАС прекращается, то есть проявляется эффект двусторонней связи. Поэтому представляют большой интерес известные БАС на основе компонентов клеточных мембран животных тканей, которые способны реагировать на изменение параметров гомеостаза организма [3, 4, 5].

В этих препаратах, полученных в виде вакцин, использованы специфические антигены, появляющиеся на поверхности клеток при некоторых процессах патологии, а именно при процессах неоплазии, в связи с чем использование вакцин направлено на элиминацию этой патологии. Эффективность действия указанных лекарственных препаратов на основе БАС прямо зависит от количества представленных в организме антигенов, то есть от их концентрации в организме, и прекращается при элиминации неоплазии, что указывает на наличие саморегулирующей двусторонней связи.

Недостатком известных лекарственных препаратов является их высокая специфичность к исходной патологии, то есть весьма узкий спектр действия, и вследствие этого они принципиально не могут иметь широкий спектр действия для восстановления (нормализации) параметров физиологического состояния организма.

Другим их недостатком является то, что эти вакцины применяются только для элиминации патологии и лишь косвенным путем направлены на нормализацию физиологического состояния организма. Кроме того, недостатком является и то, что известные БАС не активируют регенераторные и восстановительные процессы. Такие БАС должны удовлетворять повышенным требованиям к степени чистоты (гомогенности) получаемого антигена во избежание возникновения побочных эффектов.

Известные БАС получают известным способом, согласно которому животное сырье измельчают и гомогенизируют с последующим выделением из гомогената клеточных мембран животных тканей, из которых после солубилизации получают компоненты клеточных мембран в виде гликопротеинов [3, 4, 5].

Достоинством известного способа является то, что он позволяет получать высокоспецифические углеводсодержащие компоненты клеточных мембран, способные вызывать ответную реакцию иммунной системы организма на присутствие опухолевоспецифического антигена.

К преимуществам известного способа следует отнести также и то, что он позволяет

выделять углеводсодержащие компоненты клеточных мембран с помощью специфических лектинов, способных связываться с определенными концевыми углеводными остатками.

Однако при реализации операций известного способа клеточные мембраны подвергают солюбилизации с помощью детергентов, обычно неионной породы, например детергента Тритон X-100, от которых трудно избавиться в последующих операциях способа и которые сами по себе вызывают побочные эффекты при использовании средства в клинике.

Недостатком известного способа является и то, что он сравнительно мало производительен и слишком громоздок, а также зависит от наличия специфических раковых тканей, используемых в качестве исходного сырья.

Наиболее близким к заявляемому является БАС, обладающее иммуномодулирующим свойством, для нормализации физиологического состояния организма, на основе представленных органическими соединениями компонентов клеточных мембран измельченной и гомогенизированной животной ткани [6].

По сравнению с вышеуказанными средствами-аналогами известное лекарственное средство обладает еще большей эффективностью, характеризуемой повышением на 62% киллерной активности по отношению к специфическим опухолевым клеткам в сравнении с контролем. Это объясняется тем, что БАС — аналог является маркером роста злокачественных клеток и специфически активизирует киллерную активность, направленную на элиминацию таких клеток.

Однако известное БАС сохраняет все перечисленные выше недостатки, характерные для аналогов, а именно:

высокую специфичность к исходной патологии (неоплазии), то есть узкий спектр лечебного воздействия этого средства;

наличие только киллерной активности;

высокий уровень опасности возникновения побочных эффектов, связанный с тем, что известное БАС является высокомолекулярным соединением.

Как и в указанных выше случаях, свойства известного БАС, прежде всего его специфическая активность, прямо связаны со способом его получения, включающим измельчение и гомогенизацию животного сырья, его последующее ультрацентрифугирование и выделение из гомогената, содержащего клеточные мембраны, осадка, из которого после ресуспендирования и солюбилизации получают компоненты клеточных

мембран, которые используют в качестве целевого продукта.

По сравнению с вышеуказанными способами получения БАС известный способ обладает тем преимуществом, что он позволяет получать еще более высокоспецифические углеводсодержащие компоненты клеточных мембран, способные вызвать ответную реакцию иммунной системы организма на присутствие опухолевоспецифического антигена.

Кроме того, преимуществом известного способа является более высокая эффективность выделения углеводсодержащих компонентов.

Однако известному способу присущи перечисленные выше недостатки, а именно:

необходимость использовать детергенты, от которых впоследствии трудно избавиться и наличие которых вызывает отрицательные побочные эффекты при клиническом использовании этого средства;

сравнительно низкая производительность известного способа и высокая его трудоемкость;

зависимость от наличия специфических раковых тканей в качестве исходного сырья.

Известен лекарственный препарат для нормализации физиологического состояния организма человека и животных на основе представленных органическими соединениями компонентов клеточных мембран [6]. Препарат вводится в организм в течение длительного времени путем ежедневных внутривенных или внутримышечных инъекций в дозе 0,001-1000 мкг, которая зависит от возраста, пола, стадии заболевания пациента.

При внутривенном введении в качестве наполнителя используется физиологический раствор натрия хлористого, или буферный раствор.

Основным действующим началом данного препарата является БАС в виде опухолевоспецифического антигена, вызывающего иммунную реакцию организма. Для усиления такой реакции и пролонгирования эффекта выделенный антиген встраивают в липосомы. При внутримышечных инъекциях наполнителями в препарате являются различные адъюванты, состоящие в основном из масел, в которых суспендируется полученное БАС.

Недостатком известного лекарственного препарата является то, что он обеспечивает высокоспецифическую стимуляцию иммунной системы организма, которая направлена на уничтожение определенной патологии (конкретного вида неоплазии) и из-за присутствия высокомолекулярных со-

единений сопровождается проявлением ряда нежелательных побочных явлений, нарушающих другие параметры гомеостаза. В частности, при внутримышечном или подкожном введении возникает локальное, а при внутривенном введении - генерализованное воспаление, а также аллергия, гиперчувствительность замедленного типа и другие явления.

Известен препарат для нормализации физиологического состояния организма человека и животных, содержащий биологически активное средство на основе представленных органическими соединениями компонентов клеточных мембран животной ткани, и наполнитель, который накладывают на пораженные участки тела [2]

Кроме указанных недостатков, недостатком известного лекарственного препарата является то, что стимуляция иммунной системы организма возможна только путем локальной его аппликации на травмированные участки тела. Поэтому эффективность такого препарата сравнительно невелика.

Указанные недостатки частично устранены в аналогичном препарате, обладающим иммуномодулирующим действием, для нормализации физиологического состояния организма животного [7], который вводится в организм путем внутримышечной инъекции в дозе 0,75-1,0 мл/кг массы тела с интервалом 3 дня и, таким образом, используется не локально.

Недостатком этого лекарственного препарата является его сравнительно невысокая эффективность вследствие наличия в нем иммунодепрессантов, а также то, что его использование вызывает побочные эффекты из-за присутствия в его составе иммуногенов, вызывающих аллергию, гиперчувствительность замедленного типа и другое.

Использование в качестве сырья животной ткани, содержащей сравнительно большое количество иммунодепрессантов, и невозможность улучшить состав БАС, на основе которого выполняется лекарственный препарат, с помощью выполняемых в известном способе операций, существенно снижает эффективность известного БАС и препарата на его основе.

Существенным недостатком известного препарата является и то, что для обеспечения достаточной эффективности он содержит в своем составе большое количество биологически активных веществ, что обуславливает с одной стороны опасность передозировок, а с другой - увеличивает стоимость препарата.

Известен способ нормализации физиологического состояния человека и животных

при заболеваниях, вызванных преимущественно функциональной недостаточностью органов и тканей, предусматривающий введение в организм препарата на основе органических соединений компонентов клеточных мембран животной ткани [7]

Известный способ малоэффективен вследствие наличия описанных выше недостатков препарата, в том числе из-за того, что при его использовании требуется введение больших доз, содержащих до 10 мг биологически активного средства на 1 кг массы тела, что также увеличивает опасность передозировок и возникновения побочных эффектов.

Указанные выше недостатки устранены в заявляемом биологически активном средстве, обладающем иммуномодулирующим свойством, в заявляемом способе получения этого средства и препарате на основе этого средства для нормализации физиологического состояния организма человека и животных, а также в способе нормализации физиологического состояния организма человека и животных при заболеваниях, вызванных преимущественно функциональной недостаточностью органов и тканей, с использованием такого препарата.

Анализ известных БАС и известных способов их получения, совокупность признаков которых определяет технический уровень в данной области, позволил сформулировать задачу создания БАС с широким спектром иммуномодулирующего действия, с высокой степенью эффективности, лишенного при этом недостатков, связанных с наличием побочных эффектов, возникающих при применении известных БАС и выражающихся, например, в аллергии и так далее.

Решение этой задачи, которая не могла быть решена в известных изобретениях, положено в основу заявляемой группы изобретений. Оно заключается в том, что БАС, обладающее иммуномодулирующим свойством и предназначенное для нормализации физиологического состояния организма, в том числе для восстановления функциональной активности органов и тканей, на основе представленных органическими соединениями компонентов клеточных мембран гомогенизированной животной ткани, содержит модифицированные компоненты клеточных мембран с антигенной структурой, модифицированной при процессах эмбриогенеза и/или пролиферации, и/или дифференцировки клеток, и/или патологии, предшествовавшей и/или сопутствовавшей регенерации и/или репарации ткани.

Задача решается также и тем, что заявляемое БАС содержит модифицированные

компоненты плазматических клеточных мембран с антигенной структурой модифицированной при процессах эмбриогенеза и/или пролиферации и/или дифференцировки клеток, и/или патологии, предшествовавшей и/или сопутствовавшей регенерации и/или репарации ткани.

При этом заявляемое БАС может содержать модифицированные компоненты клеточных мембран в виде термостабильных при температуре $T_n \leq 120^\circ\text{C}$ компонентов, а также в виде низкомолекулярных компонентов с молекулярной массой $M=0,8-10,0$ кДа и в виде углеводсодержащих компонентов.

Заявляемое средство содержит органические соединения в следующем соотношении, мас. %:

Пептиды	28,0-60,0
Аминокислоты	0,5-31,5
Углеводы	16,0-70,0
Липиды, нуклеотиды и другие органические соединения	0,5-17,0

Заявляемое БАС содержит углеводы в составе органических соединений в следующем соотношении, мас. %, в составе.

Высокомолекулярных соединений, имеющих молекулярную массу $M_{\text{в}} > 10,0$ кДа	до 3,0
Низкомолекулярных соединений, имеющих молекулярную массу $M_{\text{н}} = 0,8-10,0$ кДа	11,5-57,9
Свободных мономеров $M_{\text{м}} < 8$ кДа	3,5-17,0

В заявляемом БАС соотношение массовых содержаний углеводов и пептидов в составе органических соединений с молекулярной массой $M_{\text{н}} = 0,8-10,0$ кДа лежит в пределах $G=0,6-2,0$.

Заявляемое БАС содержит также органические соединения в соотношении, мас. %:

Пептиды	40,0-60,0
Аминокислоты	12,9-17,1
Углеводы	16,0-32,8
Липиды, нуклеотиды и другие органические соединения	4,4-10,6

Заявляемое БАС содержит также органические соединения в соотношении, мас. %:

Пептиды	34,0-50,1
Аминокислоты	16,6-22,6
Углеводы	22,7-34,2
Липиды, нуклеотиды и другие органические соединения	5,4-10,6

Заявляемое БАС содержит также органические соединения в соотношении, мас. %:

Пептиды	28,0-33,6
Аминокислоты	16,5-31,5
Углеводы	26,9-37,9
Липиды, нуклеотиды и другие органические соединения	8,6-17,0

Заявляемое БАС содержит также органические соединения в соотношении, мас. %:

Пептиды	29,0-36,3
Аминокислоты	менее 0,5
Углеводы	57,7-70,0
Липиды, нуклеотиды и другие органические соединения	0,5-5,5

Поставленная в изобретении задача решается и тем, что в способе получения БАС, обладающего иммуномодулирующим свойством, при котором сырье из животной ткани измельчают и гомогенизируют, а из гомогената выделяют содержащий клеточные мембраны осадок, из которого после ресуспендирования получают компоненты клеточных мембран, в качестве сырья используют животную ткань, модифицированную при процессах эмбриогенеза и/или пролиферации, и/или дифференцировки клеток, и/или патологии, предшествовавшей и/или сопутствовавшей регенерации и/или репарации ткани, гомогенат которой очищают от неразрушенных элементов ткани путем фильтрации и/или центрифугирования при ускорении $150-250 g$ в течение $10-15$ мин и выделяют осадок, содержащий клеточные мембраны, который подвергают гидролизу, продукты гидролиза фильтруют и/или центрифугируют при ускорении свыше $1500 g$ в течение $20-40$ мин с выделением супернатанта продуктов гидролиза, содержащих компоненты клеточных мембран в качестве целевого продукта.

В качестве сырья используют эмбриональную ткань, дифференцирующуюся ткань тимокитов тимуса, сперматогонии и сперматозоиды семенников, плацентарную ткань, эпителиальную ткань кишечника, клетки костного мозга, регенерирующую кожную ткань, ткань регенерирующей печени, ткань регенерирующих конечностей земноводных, патологически измененную ткань, взятую до стадии регенерации.

При этом осадок, содержащий клеточные мембраны выделяют из очищенного гомогената центрифугированием при ускорении $1500-90000 g$ и/или фильтрацией через фильтр с характерным размером пор $F < 1$ мкм с последующей промывкой путем

ресуспендирования и повторного центрифугирования и/или фильтрации до получения осадка, содержащего клеточные мембраны в количестве не менее 60 мас. % от представленных в осадке органических соединений.

Кроме того, осадок, содержащий клеточные мембраны, перед гидролизом дополнительно центрифугируют при ускорении 20 000-100 000 g в градиенте плотности в течение 1-2 часов с выделением плазматических клеточных мембран.

Гидролиз проводят при температуре $T_p=4-45^\circ\text{C}$. При этом он может осуществляться в присутствии консерванта.

Поставленная задача решается также и тем, что продукты гидролиза, содержащие компоненты клеточных мембран, подвергают термообработке при температуре $T_n=60-120^\circ\text{C}$ до полной денатурации термолabile соединений и дополнительным фильтрованием и/или центрифугированием с ускорением свыше 1 500 g в течение 20-40 мин выделяют супернатант, содержащий термостабильные компоненты клеточных мембран, в качестве целевого продукта.

Кроме того, продукты гидролиза, содержащие компоненты клеточных мембран, подвергают фракционированию путем диализа через полупроницаемую пленку, и/или ультрафильтрации, и/или гельфильтрации с выделением фракции, содержащей низкомолекулярные компоненты с молекулярной массой $M \leq 10,0$ кДа, в качестве целевого продукта.

Низкомолекулярную фракцию продуктов гидролиза, содержащую компоненты клеточных мембран, подвергают аффинной хроматографии на лектинах с выделением фракции, которая содержит углеводсодержащие компоненты в качестве целевого продукта.

Поставленная в изобретении задача решается и тем, что известный препарат для нормализации физиологического состояния организма человека и животных, содержащий биологически активное средство на основе представленных органическими соединениями компонентов клеточных мембран животной ткани и наполнитель, в качестве биологически активного средства содержит в своем составе модифицированные компоненты клеточных мембран с антигенной структурой, модифицированной при процессах эмбриогенеза и/или пролиферации, и/или дифференцировки клеток, и/или патологии, предшествовавшей и/или сопутствовавшей регенерации и/или репарации ткани, при его содержании в препарате 0,001-85,0 мас. %, остальное — наполнитель

Задача решается и тем, что в препарате биологически активное средство содержит в составе модифицированных компонентов клеточных мембран органические соединения в следующем соотношении, мас. %:

Пептиды	28,0-60,0
Аминокислоты	0,5-31,5
Углеводы	16,0-70,0
Липиды, нуклеотиды и другие органические соединения	0,5-17,0

Задача решается и тем, что биологически активное средство содержит органические соединения в соотношении, мас. %:

Пептиды	40,0-60,0
Аминокислоты	12,9-17,1
Углеводы	16,0-32,8
Липиды, нуклеотиды и другие органические соединения	4,4-10,6

Задача решается тем, что биологически активное средство содержит органические соединения в соотношении, мас. %:

Пептиды	34,0-50,1
Аминокислоты	16,6-22,6
Углеводы	22,7-34,2
Липиды, нуклеотиды и другие органические соединения	5,4-10,6

Задача решается и тем, что биологически активное средство содержит органические соединения в соотношении, мас. %:

Пептиды	28,0-33,6
Аминокислоты	16,5-31,5
Углеводы	26,9-37,9
Липиды, нуклеотиды и другие органические соединения	8,6-17,0

Задача решается и тем, что биологически активное средство содержит органические соединения в соотношении, мас. %:

Пептиды	29,0-36,3
Аминокислоты	менее 0,5
Углеводы	57,7-70,0
Липиды, нуклеотиды и другие органические соединения	0,5-5,5

В качестве наполнителя может быть использован физиологический раствор натрия хлористого и/или солевой буферный раствор, и/или углеводные соединения, и/или жиры минерального, животного, растительного и/или синтетического происхождения и их смеси

Препарат может дополнительно содержать консервант

Поставленная задача решается и тем, что в известном способе нормализации физиологического состояния человека и животных при заболеваниях, вызванных

преимущественно функциональной недостаточностью органов и тканей, предусматривающем введение в организм препарата на основе органических соединений компонентов клеточных мембран животной ткани, в качестве препарата используют композицию из 0,001-85,0 мас. % биологически активного средства, содержащего в своем составе модифицированные компоненты клеточных мембран с антигенной структурой, модифицированной при процессах эмбриогенеза и/или пролиферации, и/или дифференцировки клеток, и/или патологии, предшествовавшей и/или сопутствовавшей регенерации и/или репарации ткани, и 15,0-99,999 мас. % наполнителя, а введение препарата в организм осуществляют путем внутримышечных инъекций в дозе 0,005-0,5 мг упомянутого средства на кг массы тела с интервалом между инъекциями 1-7 дней и/или ингаляций в дозе 0,012-0,12 мг средства на кг массы тела с интервалом между ингаляциями 4-48 часов, и/или сублингвального введения в дозе 0,012-0,12 мг средства на кг массы тела с интервалом между введениями 4-48 часов, и/или выпаивания в дозе 0,02-1,0 мг средства на кг массы тела с интервалом между выпаиваниями 1-10 дней и/или интального введения в пилюлях в дозе 0,02-1,0 мг средства на кг массы тела с интервалом между введениями 1-10 дней, и/или интраназального введения в суточной дозе 0,001-0,05 мг средства на кг массы тела с интервалом между введениями 2-24 часа, и/или аппликации на слизистую или раневую поверхность в виде компрессов, свечей, присыпок, мазей и гелей с интервалами между применениями 1-10 дней, — до нормализации параметров физиологического состояния.

При этом нормализацию физиологического состояния человека и животных осуществляют путем стимуляции иммунной системы, преимущественно активацией ретикулоэндотелиальной системы, Т-, В-систем, нейтрофилов и/или популяции естественных киллеров.

Установлено, что практическая эффективность заявляемого БАС, полученного заявляемым способом, заключается в его высокой биологической активности, и прежде всего, в повышенном иммуномодулирующем эффекте (свойстве).

Сопоставительный анализ свойств известных и заявляемых БАС показывает, что в то время как указанные выше известные БАС обладают узконаправленным иммуномодулирующим действием с недостаточной общебиологической эффективностью, вызывают отрицательные побочные эффекты и

требуют точности в определении дозы при их использовании, заявляемое БАС обладает широким спектром действия, высокоэффективно, некритично к передозировке и не обладает побочными эффектами.

Экспериментально установлено, что практическая эффективность заявляемого БАС, полученного заявляемым способом, заключается в его высокой биологической активности, и прежде всего в повышенном иммуномодулирующем и регенераторном эффектах (свойствах), что обеспечивает при введении в организм:

а) повышенную стимуляцию регенераторных процессов, как-то: восстановление функциональной активности печеночной ткани при гепатите и регенерацию печени после гепатэктомии, заживление язв, ран и кожного покрова при ранениях и травмах, восстановление формулы крови при кровопотерях и в других случаях;

б) проявление лечебного эффекта при лечении острых респираторных заболеваний (ОРЗ), а также воспалительных процессов (воспалении легких, маститах, эндометритах и других);

в) лечение инфекционных заболеваний животных (парагрипп и других), при котором выздоровление молодняка крупного рогатого скота наблюдалось в среднем не менее, чем в 88 % случаев, в то время как при использовании известных БАС в тех же условиях выздоровление наблюдалось в среднем не более, чем в 70 % случаев, а при спонтанном излечивании в контроле — в пределах 58-67 % случаев;

г) повышенную резистентность животных к инфекционным заболеваниям и вследствие этого снижение уровня падежа поголовья скота;

д) улучшение общебиологического состояния животных, что благоприятно сказывается на увеличении их продуктивности.

Практическое применение заявляемого БАС подтвердило его нетоксичность и отсутствие побочных явлений (аллергии, гиперчувствительности замедленного типа и тому подобного).

Указанные результаты достигнуты благодаря особым свойствам заявляемого БАС, проявление которых обеспечено наличием в его составе модифицированных компонентов выделенных из клеточных мембран с модифицированной антигенной структурой. Следует отметить, что изменение в физиологическом статусе клеток тканей находит свое отражение в модификации антигенной структуры клеточных мембран, сопровождающейся модификацией компонентов клеточных мембран и изменением иммуно-

генности ткани, а следовательно, и реакцией иммунной системы организма

Степень такой модификации антигенной структуры клеточных мембран и соответственно степень реакции иммунной системы зависит от степени изменения физиологического статуса клеток ткани.

Установлено, что повышение иммуногенности модифицированной антигенной структуры клеточных и прежде всего плазматических клеточных мембран, обеспечивается животными тканями на стадии протекания в них указанных выше процессов эмбриогенеза и/или пролиферации, и/или дифференцировки клеток, и/или патологических процессов, которые предшествовали и/или сопутствовали регенерации и/или репарации ткани.

Таковыми тканями, например, являются дифференцирующиеся тимocyты тимуса (процесс дифференцировки клеток);

сперматогонии и сперматocyты семенников, клетки костного мозга, эпителиальная ткань кишечника (процессы пролиферации и дифференцировки клеток),

эмбриональная ткань, плацентарная ткань (процессы пролиферации, дифференцировки, эмбриогенеза);

ткани регенерирующих конечностей земноводных, регенерирующая печень крыс после частичной гепатэктомии или после поражения четыреххлористым углеродом (CCl_4), регенерирующая кожная ткань, а также ткань с патологией в ней, например, при гангрене, химическом или термическом поражении (комбинация в различном сочетании вышеперечисленных процессов).

Использование описанных животных тканей в качестве сырья в заявляемом способе изготовления обеспечивает получение БАС с ожидаемыми свойствами.

Установлено также, что характерной особенностью перечисленных выше разновидностей тканей является изменение в них иммуногенной структуры клеточных мембран, сопровождающееся модификацией компонентов клеточных мембран ткани, позволяющее отдифференцировать их от интактных или покоящихся клеток тканей взрослых особей. Эта особенность модифицированных компонентов клеточных мембран указанных тканей позволяет использовать их в заявленном БАС, при введении которого в организм животного или человека обеспечивается возможность стимулирования специфической ответной реакции организма на собственную патологию. Ключевую роль в этом процессе играет иммунная система организма.

Материальными носителями информации в перечисленных выше патологических процессах и/или отклонениях от нормы в указанных выше тканях являются специфические компоненты клеточных мембран. Заявленное БАС содержит модифицированные компоненты клеточных мембран с модифицированной антигенной структурой, что позволяет при его использовании стимулировать указанную выше ответную реакцию организма.

Ответная реакция организма существенно усиливается при введении заявляемого БАС, которое содержит в своем составе модифицированные компоненты клеточных мембран в виде термостабильных компонентов, то есть стабильных при температуре нагревания $T_n \leq 120^\circ\text{C}$, в виде низкомолекулярных компонентов, то есть с молекулярной массой $M=0,8-10,0$ кДа а также в виде углеводсодержащих компонентов клеточных мембран, преимущественно в виде гликопептидов, гликолипидов, олигоуглеводов, нуклеотидов и/или свободных моноуглеводов.

При этом, благодаря высокой статической и динамической концентрации компонентов клеточных мембран, в заявляемом БАС снижается содержание иммуноингибиторов и балластных соединений, в связи с чем при наличии высокой специфической активности БАС практически лишено проявления побочных эффектов

Заявляемое БАС используют в качестве действующего начала в лекарственном препарате, в котором в зависимости от предназначения применяются различные наполнители.

Для внутреннего применения препарат назначается в виде инъекций и наполнителем служит физиологический раствор натрия хлористого или буферный солевой раствор. Для наружного применения, помимо перечисленных растворов, в качестве наполнителя могут быть использованы также и составные компоненты гелей – углеводные соединения как животного, так и растительного происхождения, например, мед, соки, мякоть растений и тому подобное, или мазей – жиры минерального, животного, растительного или синтетического происхождения и их смеси

При этом обнаружена неочевидная зависимость между эффективностью препарата и содержанием БАС. Это позволило значительно снизить содержание в препарате действующего начала при сохранении необходимой эффективности препарата и тем самым предотвратить возможность передозировок, возникновения побочных эф

факторов а также существенно снизить его стоимость.

Кроме того, обнаружено, что описанные выше новые свойства препарата позволяют использовать его для нормализации физиологического состояния организма при введении его в организм практически в любых дозах, а именно от 0,001 до нескольких граммов на 1 кг массы тела.

Указанные свойства иллюстрируются ниже в примерах конкретной реализации изобретения, в частности в примерах 9, 11, 17, 24, 27-33 и других.

В последнем изобретении заявляемой группы (способе нормализации) благодаря совокупным факторам использования нового препарата, конкретных его дозировок, кратности его введения в организм, а также способов введения его в организм человека и животных обеспечивается лечение заболеваний, вызванных преимущественно функциональной недостаточностью органов и тканей, что проиллюстрировано ниже в примерах конкретного использования изобретения, в частности в примерах 13, 16-18, 20, 21, 23, 24, 31, 32 и других.

На чертеже схематически представлены кривые температурно-временной зависимости эффективности заявляемого БАС при процессе гидролиза осадка, содержащего клеточные мембраны.

Согласно изобретению, биологически активное средство, обладающее иммуномодулирующим свойством, для нормализации физиологического состояния организма получают следующим образом.

В качестве сырья берут животную ткань, модифицированную при эмбриогенезе и/или пролиферации, и/или дифференцировке, и/или патологии, предшествующей и/или сопутствующей регенерации и/или репарации ткани. Указанную животную ткань промывают и измельчают, после чего гомогенизируют в физиологическом и/или буферном растворе до полного разрушения клеток, а гомогенизированную смесь очищают от неразрушенных элементов ткани фильтрацией и/или центрифугированием при ускорении 150-250 g в течение 10-15 мин. Из очищенного гомогената центрифугированием при ускорении 1 500-90 000 g и/или фильтрацией через фильтр с характерным размером пор $F < 1$ мкм выделяют осадок, содержащий клеточные мембраны, который подвергают гидролизу, продукты гидролиза фильтруют и/или центрифугируют при ускорении свыше 1 500 g в течение 20-40 мин с выделением супернатанта продуктов гидролиза, содержащих компоненты клеточных мембран в качестве целевого продукта для

нормализации физиологического состояния организма, в частности, при наружном применении (ингаляции, аппликации, интраназально, в составе мази и так далее).

Эффективность целевого продукта зависит от содержания в нем модифицированных компонентов клеточных мембран. Увеличения их содержания добиваются выбором сырья с повышенной интенсивностью процессов модификации в тканях и выбором оптимальных условий осуществления способа его обработки.

Выбор сырья из животной ткани зависит от интенсивности в них процессов модификации антигенной структуры клеточных мембран, которая сопровождается модификацией компонентов клеточных мембран с изменением иммуногенности ткани.

Установлено, что повышение иммуногенности модифицированной антигенной структуры клеточных мембран и прежде всего плазматических мембран клеток в живых тканях, обеспечивается на стадии протекания в них указанных выше процессов эмбриогенеза и/или пролиферации и/или дифференцировки клеток и/или патологических процессов, которые предшествовали и/или сопутствовали регенерации и/или репарации ткани.

В качестве такой животной ткани используют, в частности:

дифференцирующиеся тимocyты тимуса (процесс дифференцировки клеток);

сперматогонии и сперматocyты семенников, клетки костного мозга, эпителиальную ткань кишечника (процессы пролиферации и дифференцировки клеток);

эмбриональную ткань, планктарную ткань (процессы пролиферации, дифференцировки, эмбриогенеза);

ткани регенерирующих конечностей земноводных, регенерирующую печень крыс после частичной гепатэктомии или после поражения четыреххлористым углеродом (CCl_4), регенерирующую кожную ткань, а также ткань с патологией в ней, например, при гангрене, химическом или термическом поражении (комбинация в различном сочетании вышеперечисленных процессов).

Использование описанных животных тканей в качестве сырья в заявляемом способе изготовления обеспечивает получение биологически активного средства с ожидаемыми свойствами.

Установлено, что характерной особенностью перечисленных выше разновидностей тканей является изменение в них антигенной структуры клеточных мембран, сопровождающееся модификацией компо-

нентов клеточных мембран ткани, позволяющее отдифференцировать их от интактных или покоящихся клеток тканей взрослых особей. Эта особенность указанных тканей позволяет использовать их в заявленном БАС, при введении которого в организм животного или человека обеспечивается возможность стимулирования специфической ответной реакции организма на собственную патологию. Ключевую роль в этом процессе играет иммунная система организма.

Предпочтительнее использовать животную ткань, взятую на стадии инкремента процесса модификации. Эту стадию определяют эмпирически по характеру изменения иммуногенности. Так, в случае использования эмбриональной ткани этот период составляет первую половину эмбриогенеза. Регенерирующую печень крыс используют на 4-12 часу после частичной гепатэктомии, а в случае использования регенерирующих конечностей земноводных — на стадии образования бласты.

Для получения заявляемого средства каждую из указанных тканей после предварительного измельчения до состояния фарша гомогенизируют в тройном объеме забуференного физиологического раствора в гомогенизаторе до полного разрушения клеток и получения однородной массы. Гомогенат очищают от неразрушенных элементов ткани и целых клеток путем фильтрации и/или центрифугирования при ускорении 150-250 g в течение 10-15 мин, а из очищенного гомогената выделяют осадок, содержащий клеточные мембраны, который подвергают гидролизу.

Очистку от неразрушенных элементов ткани обеспечивают в процессе центрифугирования в диапазоне ускорений 150-250 g в течение 10-15 мин, что объясняется тем, что при более высоких ускорениях и большей продолжительности процесса происходит осаждение клеточных мембран, а при ускорениях менее 150 g очистка малоэффективна.

Очистку от неразрушенных элементов можно также обеспечить фильтрованием на крупнопористом фильтре, например через несколько слоев марли, через хлопчатобумажную ткань (бязь) или через капроновые сетки.

Осадок, содержащий клеточные мембраны, выделяют из очищенного гомогената путем центрифугирования при ускорении 1 500-90 000 g в течение 20-60 мин и/или фильтрацией.

Выбор диапазона ускорений обусловлен условиями выделения необходимой фракции клеточных мембран, при которых

выделяют максимальное количество плазматических клеточных мембран

При ускорениях, меньших 1 500 g, выделение мембран не эффективно, а свыше 90 000 g осаждаются также и другие балластные клеточные образования, ухудшающие качество БАС.

Для повышения эффективности целевого продукта осадок клеточных мембран очищают от сорбированных и заключенных внутри везикул и органелл компонентов экстракта тканей. С этой целью осадок промывают путем многократного суспендирования в свежей порции буферного раствора или дистиллированной воды с последующим повторным центрифугированием и/или фильтрацией до получения осадка, содержащего клеточные мембраны в количестве не менее 60 мас. % от представленных в нем органических соединений.

Относительное содержание клеточных мембран в осадке, выделенном для проведения гидролиза, определяют по содержанию белков и углеводов в осадке и супернатанте, полученных в процессе ресуспендирования и центрифугирования при ускорении 100 000-150 000 g в течение 40-60 мин.

Эффективность целевого продукта значительно повышается при увеличении содержания в нем компонентов плазматических клеточных мембран. С этой целью осадок, содержащий клеточные мембраны, перед гидролизом дополнительно ресуспендируют и центрифугируют при ускорении 20 000-100 000 g в течение 1-2-х часов в градиенте плотности, например, сахарозы, фикола, перкола и тому подобных соединений с выделением плазматических клеточных мембран.

При использовании сахарозы фракцию плазматических мембран клеток отбирают в диапазоне плотности $d=1,14-1,18$ согласно известным методам (H M Berman, W.Gram, M.A.Spirtes - Biochemistry et biophysical acta, -1969, -v 183, -1, -p.10-18; J.Gurd, W.Evans, H Perkins. - Biochemistry Journal, -1973, -v.135, -4, -p.827-827; G.Schapiro, J Dobocz. - Biochemistry et biophysical acta, -1974, -v.345, -3, -p.348-358)

Полученную фракцию плазматических мембран отмывают от сахарозы и сорбированных компонентов экстракта путем центрифугирования с физиологическим раствором при ускорении 20 000-100 000 g в течение 20-40 мин и получают осадок, содержащий плазматические клеточные мембраны.

Полученные осадки, содержащие клеточные и/или плазматические клеточные мембраны после ресуспендирования в физиологическом и/или буферном растворе

подвергают гидролизу, продукты которого фильтруют и/или центрифугируют при ускорении свыше 1 500 g с выделением супернатанта продуктов гидролиза, содержащих компоненты клеточных мембран, в качестве

целевого продукта. Эффективность целевого продукта возрастает при использовании компонентов клеточных мембран в виде низкомолекулярных компонентов. Это позволяет с одной стороны избежать проявления нежелательных побочных явлений, а с другой — получить препарат широкого профиля действия без ограничений на видоспецифичность животных, отвечающий требованиям медицины. С этой целью клеточные мембраны подвергали гидролизу, расщепляющему высокомолекулярные структурные образования клеточных мембран на продукты, содержащие компоненты с меньшей молекулярной массой. Эффективность продуктов гидролиза будет зависеть от специфичности гидролиза, которая в значительной степени зависит от температурно-временных характеристик.

Установлено, что иммуномодулирующее свойство заявляемого средства, в частности повышение активности макрофагов перитонеального экссудата крыс *in vitro* максимально в случае проведения гидролиза в диапазоне рабочих температур $T_p = 4-45^\circ\text{C}$ отклонения от которого нежелательны, так как:

при $T_p < 4^\circ\text{C}$ значительно возрастает продолжительность процесса гидролиза, что снижает экономическую эффективность;

при $T_p > 45^\circ\text{C}$ происходит снижение активности ферментов, обеспечивающих гидролиз сырья, и ускоряются процессы распада активных компонентов, в результате чего снижается качество целевого продукта.

Продолжительность гидролиза устанавливают по достижению максимального уровня иммуностимулирующего эффекта (свойств) заявляемого средства, в частности, по активации макрофагов перитонеального экссудата согласно НСТ-тесту.

Продолжительный гидролиз проводят в присутствии консерванта.

Повышение относительного содержания (относительной концентрации) низкомолекулярных компонентов в продуктах гидролиза по отношению к содержанию высокомолекулярных термолабильных соединений обеспечивают термообработкой гидролизата до полной денатурации термолабильных соединений, которые затем удаляют в виде осадка центрифугированием при ускорении не менее 1 500g в течение 20-40 мин и/или фильтрацией. Супернатант,

содержащий термостабильные компоненты, используют в качестве целевого продукта

Термообработку продуктов гидролиза ведут в диапазоне температур $T_H = 60-120^\circ\text{C}$, так как выход за пределы этого диапазона приводит к уменьшению специфической активности БАС.

Так, при температуре $T_H < 60^\circ\text{C}$ не все белки подвергаются денатурации, вследствие чего в целевом продукте содержание термолабильных соединений будет повышенным. За счет этого специфическая активность средства будет сниженной. При температуре $T_H > 120^\circ\text{C}$ происходит скачкообразное увеличение скорости структурных изменений в пептидных и углеводных компонентах целевого продукта, что также снижает его качество.

После термообработки выделение термостабильных компонентов осуществляют центрифугированием при ускорении не менее 1 500 g в течение 20-40 мин так как при уменьшении величины ускорения существенно снижается степень удаления денатурированных термолабильных соединений, а проведение его в течение 20-40 мин является наиболее оптимальным.

Коагулированные денатурированные термолабильные соединения можно отделить от супернатанта фильтрованием через бумажный фильтр.

Целевой продукт, содержащий термостабильные компоненты клеточных мембран, обладает большей специфической активностью по сравнению с водорастворимыми компонентами и позволяет решить более широкий спектр задач. Он может быть применен и качестве инъекционного средства как в ветеринарии, так и в медицине.

Дальнейшее повышение специфической активности БАС достигается выделением низкомолекулярных компонентов с молекулярной массой $M \leq 10,0$ кДа из продуктов гидролиза путем диализа через полупроницаемую пленку и/или ультрафильтрацией и/или гелефильтрацией, что позволяет полностью удалить высокомолекулярные соединения, способные вызывать побочные эффекты.

Как уже отмечалось выше, эффективность заявляемого БАС в значительной мере определяется содержанием углеводсодержащих компонентов клеточных мембран с молекулярной массой $M = 0,8-10,0$ кДа. В связи с этим для получения целевого продукта с наиболее высокой специфической активностью из низкомолекулярной фракции путем аффинной хроматографии на лектинах выделяют углеводсодержащие компоненты в виде гликопептидов, гликолипидов,

олигоуглеводов, нуклеотидов, а также свободных моноуглеводов, которые используют в качестве целевого продукта.

Достижимая таким образом повышенная величина эффективности целевого продукта и отсутствие побочных эффектов позволяют широко использовать полученный целевой продукт в медицине.

Заявляемое БАС в качестве действующего начала используется для приготовления лекарственного препарата, где его концентрация зависит от цели использования препарата. Для выпойки и подкормки животных концентрация БАС в используемом препарате невысока и возрастает в препаратах для инъекционного применения, а также в мазях, гелях и порошках.

В зависимости от назначения препарата в них используют различные наполнители. Так, в препаратах для инъекций, ингаляций, аппликаций и интраназального использования применяют физиологический раствор натрия хлористого или солевой буферный раствор. Углеводные соединения в качестве наполнителя применяются в препаратах, предназначенных для подкормки пчел (например, 10%-ный сахарный сироп) или для приготовления гелей (например, мед, соки и мякоть растений). Для мазей в качестве наполнителя применяют жиры минерального, животного, растительного или синтетического происхождения и их смеси.

Ниже приведены примеры конкретного выполнения заявленной группы изобретений, а также изложены использованные методы определения состава БАС и их состав.

Пример 1.

Для изготовления заявляемого биологически активного средства в качестве сырья была использована эмбриональная ткань крупного рогатого скота на стадии первой половины беременности коров. Из эмбрионов после дезинфицирования в слабом растворе перманганата калия (KMnO_4) вырезали кожную и мышечную ткань, печень, селезенку, поджелудочную железу, почки, легкие и сердце, которые подвергали измельчению и гомогенизации. Затем 10 кг фарша смешивали с 30 кг сантимолярного фосфатного солевого буферного раствора (0,01 M PBS) pH 7,2, содержащего сантимолярный двузамещенный фосфат натрия и пятнадцатисантимолярный раствор натрия хлористого (0,01 M Na_2HPO_4 и 0,15 M NaCl) и подвергали гомогенизации на коллоидной мельнице до получения однородной массы. Неразрушенные элементы ткани удаляли в виде осадка после центрифугирования при ускорении 150 g в течение 15 мин. Супернатант после удаления флотированного жира

фильтрованием через хлопчатобумажную ткань (бязь) подвергали центрифугированию при ускорении 1 500 g в течение 60 мин. Полученный осадок, содержащий клеточные мембраны в количестве 60% от представленных в нем органических соединений, ресуспендировали в 15 кг сантимолярном фосфатном буфере (0,01 M PBS) и центрифугировали при ускорении 5 000 g в течение 40 мин. Осадок вновь ресуспендировали в 7,5 кг дистиллированной воды и центрифугировали при ускорении 20 000 g в течение 30 мин, после чего операцию ресуспендирования в воде повторяли еще раз и центрифугировали 40 мин. Осадок 4-й раз ресуспендировали в 7,5 кг сантимолярном фосфатном буфере (0,01 M PBS) и центрифугировали при ускорении 20 000 g в течение 20 минут.

Промытый таким образом осадок, содержащий 90% клеточных мембран, после ресуспендирования в 5,0 кг сантимолярном фосфатном солевом буферном растворе (0,01 M PBS) и добавления консерванта до конечной концентрации 0,08 мас. % подвергали гидролизу при температуре 4°C в течение 6 недель.

Полученный гидролизат центрифугировали при ускорении 1 500 g в течение 40 мин с выделением супернатанта продуктов гидролиза, содержащих компоненты клеточных мембран, в качестве целевого продукта, состав органических соединений которого и вызываемая им специфическая активность в виде количественного показателя эффектов БАС представлены в таблицах 1 и 2.

Целевой продукт, содержащий БАС в количестве 1,0 мас. %, а остальное – наполнитель, использовали интраназально в качестве лекарственного препарата для лечения маститов у женщин. В каждую ноздрю вносили по 2 капли препарата с последующим массажем для растекания по слизистой. Процедуру повторяли 2-3 раза в день. Лечебный эффект проявлялся через 1-3 дня и его контролировали по состоянию груди (по наличию уплотнений, гнойных выделений) и анализу крови.

Пример 2.

Эмбриональную ткань, полученную так же, как в примере 1, подвергали измельчению и гомогенизации в тройном объеме физиологического раствора натрия хлористого на гомогенизаторе с ножевыми блендерами до получения однородной массы разрушенных клеток. Для удаления неразрушенных элементов ткани, в том числе элементов соединительной ткани, гомогенизированную массу центрифугировали при ускорении 250g в течение 10 минут. После центрифуги-

рования осадок удаляли, а полученный супернатант фильтровали через хлопчатобумажную ткань и подвергали повторному центрифугированию при ускорении 90 000 g в течение 20 мин. Выделенный в результате центрифугирования осадок ресуспендировали в половинном, от первоначального, объеме физиологического раствора и центрифугировали при тех же условиях. После этого осадок дважды ресуспендировали в дистиллированной воде и один раз в физиологическом растворе с последующим центрифугированием при ускорении 90 000 g в течение 20 мин. Полученный таким образом осадок, содержащий клеточные мембраны, ресуспендировали в 4-х объемах физиологического раствора и после добавления консерванта до конечной концентрации 0,08 мас. % подвергали гидролизу при температуре $T_p=20^\circ\text{C}$ в течение 8 дней.

Полученный гидролизат центрифугировали при ускорении 15 000 g в течение 20 мин с выделением супернатанта в качестве целевого продукта, состав органических соединений которого и вызываемая им специфическая активность в виде количественного показателя эффекта БАС представлены в таблицах 1 и 2.

Целевой продукт, содержащий БАС в количестве 1,0 мас. %, а остальное наполнитель, смешивали с 5 объемами физиологического раствора натрия хлористого и использовали в качестве лекарственного препарата в виде компрессов для лечения варикозного расширения вен на ногах. Компрессы накладывали на ночь ежедневно. Лечебный эффект проявлялся на 5-14 день и контролировали по состоянию сосудов, отечности ног и болевым ощущениям.

Пример 3

Гомогенизацию эмбриональной ткани осуществляли так же, как и в примере 2. Для удаления неразрушенных элементов ткани гомогенизированную массу фильтровали через хлопчатобумажную ткань (бязь) на нутч-фильтре под вакуумом. Затем 50 кг фильтрата подвергали ультрафильтрации на полых волокнах ВПУ-100 ПА (ТУ 6-12-151-87) аппарата АР-2,0. В процессе рециркуляции через полые волокна из гомогената удаляли экстракт ткани, компоненты которого имели молекулярную массу $M<100\text{кДа}$, а высокомолекулярные соединения концентрировали. Гомогенат массой 50 кг концентрировали до получения суспензии клеточных мембран масса которой составила 5 кг. Суспензию затем размешивали в 45 кг физиологического раствора и вновь концентрировали, очищая таким образом фракцию клеточных мембран от компонентов эксудата с моле-

кулярной массой $M<100\text{кДа}$. Эту операцию проводили 4 раза. Полученная суспензия содержала 60 мас. % клеточных мембран от представленных в ней органических соединений. После добавления 10 кг физиологического раствора подвергали аутолизу при температуре 45°C в течение 48 часов.

Полученный гидролизат фильтровали на бумажном фильтре, а фильтрат использовали в качестве целевого продукта, состав органических соединений которого и вызываемая им специфическая активность в виде количественного показателя эффекта БАС представлены в таблицах 1 и 2.

Целевой продукт, содержащий БАС в количестве 1,0 мас. %, а остальное — наполнитель, смешивали с 9 объемами огуречной мякоти и использовали в качестве лекарственного препарата в виде гелевой маски для лиц в косметических целях. При длительном хранении в гель добавляли консервант (нипагин и нипазол в соотношении массовых частей 5:1) в конечной концентрации 0,1 мас. %. Гель накладывали на лицо на 2-3 часа. Процедуру повторяли 1-2 раза в неделю. Лечебный эффект проявлялся после 2-6 сеансов и его контролировали по состоянию кожи.

Пример 4.

Гомогенат эмбриональной ткани, очищенный от неразрушенных элементов ткани в примере 3, подвергали фильтрации на полых волокнах GF/S, задерживающих частицы с размером свыше 1 мкм. Все последующие операции проводят так же, как и в примере 3. В результате получен целевой продукт, обладающий таким же составом и свойствами.

Пример 5.

Осадок, содержащий клеточные мембраны, полученный в примере 1 после 4-х кратной промывки, суспендировали в концентрированном растворе сахарозы с конечной плотностью $d_1>1,25$ полученной суспензии, которую подвергали ультрацентрифугированию при ускорении 100 000 g в течение 60 мин в ступенчатом градиенте плотности сахарозы $d_1>1,25$; $d_2=1,20$; $d_3=1,18$; $d_4=1,16$; $d_5=1,14$; $d_6=1,12$. Фракцию плазматических мембран отбирали в интервале плотности сахарозы, величина которой составляет $d=1,18-1,14$. Затем отмывали мембраны от сахарозы путем центрифугирования в физиологическом растворе при ускорении 20 000 g в течение 60 мин. Осадок ресуспендировали в 4-х кратном объеме 0,01 M PBS pH 7,2 и после добавления консерванта до конечной концентрации 0,08 мас. % суспензию плазматиче-

ческих клеточных мембран подвергали гидролизу при температуре $T_p=4^\circ\text{C}$ в течение 6 недель.

Полученный гидролизат центрифугировали при ускорении 1 500 g в течение 40 мин с выделением супернатанта в качестве целевого продукта, состав органических соединений которого и вызываемая им специфическая активность в виде количественного показателя эффекта БАС представлены в таблицах 1 и 2.

Целевой продукт, содержащий БАС в количестве 1,0 мас.%, а остальное — наполнитель, использовали в качестве лекарственного препарата для ингаляций при лечении бронхопневмонии. Ежедневно на ночь через ингалятор делали 10-15 резких вдохов и выдохов через нос. Лечебный эффект проявлялся через 2-8 дней и его контролировали по состоянию легких и анализу крови.

Пример 6.

Суспензию клеточных мембран в сахарозе с конечной плотностью $d>1,25$, полученную в примере 5, подвергали центрифугированию при ускорении 20 000 g в течение 2 часов в таком же ступенчатом градиенте сахарозы. Все последующие операции проводили так же, как и в примере 5, с получением целевого продукта, обладающего таким же составом и свойствами.

Пример 7.

Для определения содержания компонентов клеточных мембран в процентном отношении (по массе) к компонентам соединительной ткани и экстракта в заявляемом БАС, полученном в примерах 1-6, проводили аминокислотный анализ, а также определяли количество белков и углеводов в осадке и супернатанте, полученных ультрацентрифугированием суспензии клеточных мембран при ускорении 100 000-150 000 g в течение 60 мин до проведения операции гидролиза.

Соотношение количества белка во всем осадке и во всем супернатанте указывало на соотношение по белку компонентов клеточных мембран к белкам экстракта.

Содержание белка в осадке и супернатанте проводили после ультрацентрифугирования суспензии. После удаления супернатанта к 0,1 мл осадка добавляли 4,9 мл физиологического раствора и после суспендирования отбирали 0,1 мл для определения количества белка фотометрически по интенсивности окраски раствора, согласно методу SDS-Лоури (U.K.Laemmli.-Nature, 1970, v.227, 5259, p.680-685).

Для определения количества белка в супернатанте отбирали 0,1 мл. При белковом анализе средства, полученном в примерах 1, 2 и 5, содержание компонентов клеточных

мембран составляло $88\pm 8\%$, в примере 3 — $70\pm 10\%$.

Компоненты соединительной ткани определяли аминокислотным анализом по наличию оксипролина и оксипролина. В заявляемом БАС эти аминокислоты отсутствовали.

Определение количества углеводов в исследуемых образцах проводили согласно антроновой реакции (S.Seifter, S.Dayton, C.Hovic.-Arch.Biochemistry and Biophysical, 1950, 25, 1, p.191-200). При этом учитывали общее содержание углеводов после гидролиза и содержание свободных углеводов в виде мономером. По разнице значений величины в этих измерениях определяли количество свободных углеводов в составе различных соединений.

Для проведения общего гидролиза брали 1,0 мл исследуемого образца и смешивали с 1 мл четырехнормального раствора соляной кислоты (4,0 N HCl). Гидролиз осуществляли при температуре 105°C в течение 2 часов, после чего гидролизат упаривали в эксикаторе с сухим едким натром (NaOH) под вакуумом. Высушенную пробу растворяли в 1,0 мл дистиллированной воды и использовали для анализа.

Определение количества свободных углеводов непосредственно в БАС или после кислотного гидролиза проводили следующим образом: 1 мл пробы смешивали с 1 мл дистиллированной воды, после чего добавляли при постоянном перемешивании при температуре -5°C 4 мл 0,2%-ного антронового реактива, приготовленного на 95%-ной серной кислоте (H_2SO_4). Полученную смесь кипятили при температуре 95°C в течение 10 мин и после охлаждения определяли оптическую плотность на длине волны 620 нм. В качестве стандарта применяли глюкозу в концентрации 20 мкг/мл.

Содержание концентрации углеводов, входящих в состав структурных соединений с молекулярной массой $M>0,8$ кДа, в заявляемом БАС, полученном в примерах 1, 2, 3 и 5 соответственно, составляло 20,5%; 24,5%; 12,5%; и 26,4% по отношению к остальным тканевым ингредиентам.

Здесь и далее по тексту значение экспериментально определенных величин выражено их средними значениями с пределами отклонений от среднего, вычисленными с учетом критерия Стьюдента.

Пример 8.

Супернатант гидролизата, полученный в примере 1, подвергали термобработке при различных температурах нагрева (термообработки) $T_{H1}=55^\circ\text{C}$, $T_{H2}=60^\circ\text{C}$.

$T_{H3}=95^{\circ}\text{C}$, $T_{H4}=120^{\circ}\text{C}$ и $T_{H5}=135^{\circ}\text{C}$ Нагрев вели до полной денатурации термолабильных соединений в составе продуктов гидролиза, затем центрифугировали при ускорении свыше 1 500 g в течение 30 мин с выделением супернатанта, содержащего термостабильные компоненты в качестве целевого продукта. Полученный целевой продукт в каждом случае обладал своим иммуномодулирующим эффектом, значения которого указаны в таблице 3, где представлена специфическая активность (активация макрофагов) в зависимости от выбранного диапазона температуры нагрева гидролизата и за пределами этого диапазона. Оптимальной является температура нагрева $T_H=95^{\circ}\text{C}$, при которой получаемый целевой продукт обеспечивал максимальное, по сравнению с контролем, усиление ферментативной и фагоцитарной активности, которое соответственно составляло $102,3 \pm 5,5\%$ и $92,1 \pm 7,4\%$. При $T_H=55^{\circ}\text{C}$ повышение величины специфической активности в сравнении с контролем составляет в среднем $76,8 \pm 4,6\%$ – по НСТ-тесту и $53,8 \pm 5,1\%$ – по фагоцитозу. При $T_H > 120^{\circ}\text{C}$ происходит скачкообразное увеличение скорости разложения пептидов и белков, вызывающее изменения в углеводных компонентах, приводящие к структурным изменениям компонентов целевого продукта, что отражается на снижении величины специфической активности средства. Так, при $T_H=135^{\circ}\text{C}$ повышение специфической активности заявляемого средства по сравнению с контролем составляет в среднем $68,4 \pm 5,0\%$ – по НСТ-тесту и $66,2 \pm 6,1\%$ – по фагоцитозу. Максимальная величина специфической активности БАС по сравнению с контролем обеспечивается в диапазоне температур $T_H=60-120^{\circ}\text{C}$, при котором повышение активности макрофагов перитонеального экссудата крыс (in vitro) составляет в среднем $102,3 \pm 5,5\%$ – по усилению ферментативной активности (НСТ-тест), а по усилению фагоцитарной активности (по E.coli) – $92,1 \pm 7,4\%$.

Пример 9.

Супернатант гидролизата, полученный в примере 1, подвергали термообработке кипячением при температуре нагрева $T_H=95^{\circ}\text{C}$ до полной денатурации термолабильных соединений и после охлаждения центрифугировали при ускорении 1 500 g в течение 40 мин. Осадок в виде денатурированных соединений удаляли, а в качестве целевого продукта использовали супернатант, который содержал термостабильные компоненты.

Содержание органических соединений в продуктах гидролиза и количественные по-

казатели эффектов БАС указаны в таблицах 1 и 2.

Целевой продукт, содержащий БАС в количестве 1,0 мас. %, а остальное – наполнитель, использовали в качестве лекарственного препарата для лечения дерматозов в виде мази, которую готовили путем смешивания ланолина, вазелина и целевого продукта БАС в соотношении 1:3:1 массовых частей. Мазь втирали в кожу ежедневно. Лечебный эффект проявлялся через 2-8 дней и его контролировали по состоянию кожи.

Пример 10.

Гидролизат, полученный в примере 1, подвергали термообработке кипячением при температуре нагрева $T_H=95^{\circ}\text{C}$ до полной денатурации термолабильных соединений и после охлаждения центрифугировали при ускорении 1 500 g в течение 40 мин. Осадок в виде денатурированных соединений удаляли, а супернатант, содержащий термостабильные компоненты, использовали в качестве целевого продукта, обладающего таким же составом и свойствами, как в примере 9.

Пример 11.

Супернатант гидролизата, полученный в примере 3, подвергали термообработке при температуре $T_H=95^{\circ}\text{C}$ до полной денатурации термолабильных соединений и после охлаждения фильтровали через фильтровальную бумагу на нутч-филт্রে. Фильтрат, содержащий термостабильные компоненты, использовали в качестве целевого продукта.

Содержание органических соединений в продуктах гидролиза и количественные показатели эффектов БАС указаны в таблицах 1 и 2.

Целевой продукт лиофильно высушивали и использовали сублингвально в качестве лекарственного препарата для лечения маститов у женщин. Процедуру выполняли ежедневно. Лечебный эффект проявлялся через 1-3 дня и его контролировали по состоянию груди (по наличию уплотнений, гнойных выделений) и анализу крови.

Пример 12.

Гидролизат, полученный в примере 3, подвергали термообработке при температуре $T_H=95^{\circ}\text{C}$ до полной денатурации термолабильных соединений и после охлаждения фильтровали через фильтровальную бумагу на нутч-филт্রে. Фильтрат, содержащий термостабильные компоненты, использовали в качестве целевого продукта, обладающего таким же составом и свойствами, как в примере 11.

Пример 13.

Супернатант гидролизата, полученный в примере 5, подвергали термообработке кипячением при температуре нагрева $T_n=95^\circ\text{C}$ до полной денатурации термолабильных соединений и после охлаждения центрифугировали при ускорении 50 000 g в течение 20 мин. Осадок в виде денатурированных соединений удаляли, а в качестве целевого продукта использовали супернатант, который содержал термостабильные компоненты.

Содержание органических соединений в продуктах гидролиза и количественные показатели эффектов БАС указаны в таблицах 1 и 2.

Целевой продукт, содержащий БАС в количестве 0,5 мас.%, а остальное – наполнитель, использовали в качестве лекарственного препарата для лечения маститов коров в виде инъекций, которую осуществляли внутримышечно в дозе 0,05 мл/кг массы тела каждый третий день. Лечебный эффект проявлялся после 1-4 инъекции и его контролировали по состоянию вымени и количеству гнойных выделений из сосков.

Пример 14.

Гидролизат, полученный в примере 5, подвергали термообработке кипячением при температуре нагрева $T_n=95^\circ\text{C}$ до полной денатурации термолабильных соединений и после охлаждения центрифугировали при ускорении 50 000 g в течение 20 мин. Осадок в виде денатурированных соединений удаляли, а в качестве целевого продукта использовали супернатант, который содержал термостабильные компоненты, обладающие таким же составом и свойствами как в примере 13.

Пример 15.

Супернатант гидролизата, полученный в примере 1, подвергали фракционированию на ультрафильтрационной установке "Amicon" с использованием ультрафильтров, пропускающих соединения с молекулярной массой, меньшей или равной: 50,0 кДа; 10,0 кДа; 5,0 кДа; 1,0 кДа; 0,8 кДа и 0,5 кДа.

Биологическую активность полученных фракций, содержащих соединения с молекулярной массой: 1) $M_1 > 50,0$ кДа; 2) $10,0$ кДа $< M_2 < 50,0$ кДа; 3) $M_3 < 10,0$ кДа; 4) $M_4 < 5,0$ кДа; 5) $M_5 < 1,0$ кДа; 6) $M_6 < 0,8$ кДа и 7) $M_7 < 0,5$ кДа, анализировали по их способности активизировать макрофаги перитонеального экссудата крыс согласно НСТ-тесту. Результаты исследований сведены в таблицу 4.

Анализ данных таблицы 4 позволяет сделать следующие выводы:

1) распределение специфической активности по фракциям имеет выраженный мак-

симум, который приходится на диапазон молекулярных масс от 0,8 до 10,0 кДа;

2) снижение специфической активности при молекулярной массе $M > 10,0$ кДа связано с усилением влияния ингибиторов в целевом продукте и снижением концентрации активной субстанции;

3) снижение специфической активности при молекулярной массе $M < 0,8$ кДа связано со снижением концентрации активной субстанции, представленной в виде олигомерных соединений с $M > 0,8$ кДа.

Пример 16.

Супернатант гидролизата, полученного так же, как и в примерах 1 и 9, подвергали ультрафильтрации на полых волокнах ВПУ-15-ПА (ТУ 6-12-151-87) аппарата АР-2,0. Полученный ультрафильтрат, содержащий низкомолекулярные компоненты с молекулярной массой $M \leq 10,0$ кДа, использовали в качестве целевого продукта, который содержал низкомолекулярные компоненты с $M \leq 10,0$ кДа.

Содержание органических соединений в продуктах гидролиза и количественные показатели эффектов БАС указаны в таблицах 1 и 2.

Целевой продукт, содержащий БАС в количестве 0,1 мас.%, а остальное – наполнитель, использовали в качестве лекарственного препарата для лечения экспериментального гепатита крыс в виде инъекций, которые осуществляли внутримышечно в дозе 0,05 мл/кг массы тела через день (характер и результаты лечения более подробно изложены в примерах 42 и 43).

Пример 17.

Гидролизат, полученный в примере 3, подвергали диализу в течение 16-24 часов через целлофановую пленку против физиологического раствора, 1 кг которого содержал 0,8 г консерванта. Полученный диализат использовали в качестве целевого продукта, который содержал низкомолекулярные компоненты с молекулярной массой $M \leq 10,0$ кДа.

Содержание органических соединений в продуктах гидролиза и количественные показатели эффектов БАС указаны в таблицах 1 и 2.

Полученный целевой продукт, содержащий БАС в количестве 0,1 мас.%, а остальное – наполнитель, использовали в качестве лекарственного препарата для нормализации параметров гомеостаза у телят в виде инъекций, которые вводили внутримышечно телятам, с отклонениями от нормы, в дозе 0,05 мл/кг массы тела каждые 1-2 месяца. Контроль эффекта осуществляли ежемесячным взвешиванием животных, результаты

которого свидетельствовали о повышении на 60-100% среднесуточных привесов по сравнению с контрольной группой необработанных препаратом животных.

Пример 18.

Супернатант гидролизата, полученного так же, как и в примерах 5 и 13, подвергали ультрафильтрации на полых волокнах ВПУ-15-ПА (ТУ 6-12-151-87) аппарата АР-2,0. Полученный ультрафильтрат, содержащий низкомолекулярные компоненты с молекулярной массой $M \leq 10,0$ кДа, использовали в качестве целевого продукта, который содержал низкомолекулярные компоненты с молекулярной массой $M \leq 10,0$ кДа.

Содержание органических соединений в продуктах гидролиза и показатели специфической активности полученного средства, определенные экспериментально, указаны в таблицах 1 и 2.

Целевой продукт, содержащий БАС в количестве 0,1 мас.%, а остальное – наполнитель, использовали в качестве лекарственного препарата в виде инъекций для лечения экспериментальной язвы желудка крыс. 20 ежедневных инъекций осуществляли внутримышечно в дозе 0,05 мл/кг и 0,5 мл/кг массы тела (характер и результаты лечения более подробно изложены в примере 44).

Пример 19.

Супернатант гидролизата, полученный в примере 1, подвергали гелевой фильтрации в сефадексе G-25 на колонке диаметром $d=26$ мм и длиной $h=600$ мм, уравновешенной децимолярным (0,01 М) фосфатным буфером pH 7,2, содержащим пятнадцатисантимольный хлористый натрий (0,15 М NaCl). Фракционирование супернатанта гидролизата, согласно молекулярным массам, осуществляли путем элюирования колонки тем же буферным раствором и контролировали хроматографический профиль элюата спектрометрически при длине волны 280 нм. Фракция низкомолекулярных компонентов гидролизата элюировалась в качестве целевого продукта, обладающего таким же составом и свойствами, как в примере 16.

Пример 20.

Фракцию низкомолекулярных компонентов, полученную в примере 16, подвергали аффинной хроматографии на Кон-А-Сефарозе фирмы "Pharmacia". Колонку диаметром 2 см и длиной 10 см заполненную Кон-А-Сефарозой, подготавливали к работе согласно рекомендациям фирмы.

После промывки посадочным буферным раствором, содержащим двадцатимиллимолярный трис-солянокислый буфер (0,02 М

Трис-HCl) и pH 7,4 и полутора децимолярный хлористый натрий (0,15 М NaCl), Кон-А-Сефарозу обрабатывали заряжающим буферным раствором, содержащим децимолярный натрий-ацетатный буфер (0,1 М CH_3COONa) pH 6,5, миллимолярный хлористый кальций (1 мМ CaCl_2), миллимолярный хлористый магний (1 мМ MgCl_2) и одномолярный хлористый натрий (1 М NaCl), а затем повторно промывали посадочным буферным раствором.

Целевой продукт получали так же, как в примере 16, и после титрования до pH 7,4, наносили на колонку и промывали посадочным буфером до полного удаления несорбированных соединений. Выделение углеводсодержащих компонентов, аффинно связанных с Кон-А-Сефарозой, проводили децимолярным натрийацетатным буфером (0,1 М CH_3COONa) pH 3,5 в физиологическом растворе натрия хлористого. Контроль элюции осуществляли спектрофотометрически при длине волны 280 нм. Аффинно выделенную фракцию после нейтрализации ее кислотности раствором едкого натра (NaOH) до pH 7,4 и добавления консерванта в конечной концентрации 0,08 мас.% получали в качестве целевого продукта, состав органических соединений которого и вызываемая им специфическая активность представлены в таблицах 1 и 2.

Целевой продукт, содержащий БАС в количестве 0,1 мас.%, а остальное – наполнитель, использовали в качестве лекарственного препарата для лечения воспаления яичников в виде инъекций, которые осуществляли внутримышечно в дозе 0,05 мл/кг массы тела через день. Лечебный эффект проявлялся через 6-10 инъекций и его контролировали по параметрам воспалительной реакции.

Пример 21.

Фракцию низкомолекулярных компонентов, полученную в примере 16, подвергали аффинной хроматографии на Кон-А-Сефарозе так же, как и в примере 20.

Содержание органических соединений в продуктах гидролиза и количественные показатели эффектов БАС указаны в таблицах 1 и 2.

Целевой продукт, содержащий БАС в количестве 0,1 мас.%, а остальное – наполнитель, использовали в качестве лекарственного препарата для лечения сахарной гангрены конечностей у больных диабетом в виде инъекций, которые осуществляли внутримышечно в дозе 0,05 мл/кг массы тела через 1-3 дня. Лечебный эффект проявлялся через 5-15 инъекций и его контролировали по состоянию ткани и сосудов конечностей.

Пример 22.

Для определения зависимости эффективности заявляемого БАС от содержания в нем модифицированных компонентов клеточных мембран использовали сырье из животных тканей, в которых проходили процессы эмбриогенеза и/или пролиферации и/или дифференцировки клеток, и/или патологии, предшествовавшей и/или сопутствовавшей регенерации и/или репарации ткани. Полученные ткани обрабатывали так же, как и в примере 9. Свойства целевого продукта, полученного при этом, то есть с использованием ткани каждого из указанных видов модификаций клеточных структур, а именно клеточных мембран, сведены в таблицу 5.

Анализ таблицы 5 показывает, что наличие иммуномодулирующего эффекта у заявляемого средства и существенное усиление этого эффекта зависит от используемого сырья, из которого получают продукты гидролиза, содержащие модифицированные компоненты клеточных мембран.

Так, в качестве сырья из животной ткани, взятого именно на стадии пролиферации дифференцировки клеток, были использованы сперматогонии и сперматциты семенников крыс, клетки костного мозга, эпителиальная ткань кишечника крыс, а в качестве сырья, с процессами эмбриогенеза была использована эмбриональная ткань крыс. В качестве сырья с процессами патологии, предшествовавшей регенерации, была использована ткань регенерирующих конечностей аксолотля, печеночная ткань крыс после частичной гепатэктомии, а с патологией, сопутствующей регенерации – печеночная ткань крыс после подкожного введения четыреххлористого углерода (CCl_4).

Одновременно с полученными экспериментальными данными в таблице 5 для сравнения отражены также сведения по иммуномодулирующему эффекту, полученному при использовании в качестве сырья мышечной и печеночной интактной ткани взрослых особей крыс-самцов.

Анализ данных таблицы 5 показывает, что иммуномодулирующий эффект заявляемого БАС при использовании тканей, взятых на стадии протекания в них процесса эмбриогенеза, пролиферации и патологии, которая предшествовала и/или сопутствовала регенерации и/или репарации, существенно выше, чем у известных средств, использующих сырье из животной ткани, в котором указанные процессы отсутствовали.

Кроме того, можно также сделать вывод о том, что из тканей, в которых наблюдается указанные процессы, наибольшим иммуномодулирующим эффектом обладают регенерирующая печеночная ткань и эмбриональная ткань.

Пример 23.

Для изготовления заявляемого средства в качестве сырья использовали регенерирующую печень крыс на 4-12 часу после гепатэктомии, выполненной согласно известному методу (G.M.Higgins, R.M.Anderson.-Experimental pathology of the liver.-Arch.Pathology.-1931.-N 12.-p-186).

Печеночную ткань обрабатывали так же, как и в примерах 1, 9 и 16.

Специфическую активность полученных целевых продуктов определяли экспериментально по активации репарационных способностей гепатоцитов печени крыс после поражения четыреххлористым углеродом (CCl_4), при котором активность Na,K-ATPase восстанавливалась на $38,6 \pm 3,4\%$ при использовании целевого продукта, полученного так же, как в примере 1, на $54,6 \pm 4,2\%$ как в примере 9 и на $94,5 \pm 8,6\%$ – как в примере 16, по сравнению с контрольной группой животных, которым заявляемое средство не вводилось.

Активность аминотрансфераз в крови восстанавливалась, соответственно, на $71,6 \pm 10,3\%$ (1); $89,2 \pm 6,2\%$ (9) и $98,7 \pm 1,3\%$ (16), а концентрация калия в гепатоцитах печени – на $28,4 \pm 4,4\%$ (1); $36,8 \pm 5,4\%$ (9) и $71,8 \pm 8,8\%$ (16).

Целевой продукт, содержащий БАС в количестве 0,1 мас. % а остальное – наполнитель, использовали в качестве лекарственного препарата для лечения телят больных гепатитом в виде инъекций, которые осуществляли внутримышечно в дозе 0,05 мл/кг массы тела каждый 3 день. Лечебный эффект проявлялся через 4-8 инъекций и его контролировали по активности аминотрансфераз в крови.

Пример 24.

Для изготовления заявляемого средства в качестве сырья использовали жмых семенников быков, полученный после выделения из них лидазы путем экстракции 3%-ной уксусной кислотой гомогената ткани.

Полученный жмых семенников, являющийся отходом производства лидазы, повторно гомогенизировали в тройном объеме физиологического раствора на ножевых гомогенизаторах и центрифугировали при ускорении 250 g в течение 12 мин для удаления неразрушенных элементов ткани. Дальнейшие операции для получения целевого про-

дукта проводили так же, как и в примерах 1, 9, 16.

Специфическую активность полученных целевых продуктов определяли экспериментально по активации макрофагов перитонеального экссудата и нейтрофилов крови крыс. При использовании целевого продукта, полученного так же, как в примере 16, ферментативная активность макрофагов увеличилась на $125,2 \pm 14,1\%$, а фагоцитарная активность по *E.coli* – на $115,4 \pm 10,8\%$. Для нейтрофилов крови эти показатели увеличивались на $115,4 \pm 14,5\%$ и $83,4 \pm 8,6\%$ соответственно.

Целевой продукт, содержащий БАС в количестве 1,0 мас.%, а остальное – наполнитель, смешивали с 50 объемами воды и использовали в качестве лекарственного препарата в виде выпойки для нормализации параметров гомеостаза кур. Выпойку препаратом кур с отклонениями указанных параметров от нормы осуществляли в дозе 5 мл/кг массы тела каждые 2-6 недели. Контроль эффекта осуществляли подсчетом яйценоскости, результаты которого свидетельствовали о ее повышении на 20-40% по сравнению с контрольной группой необработанных препаратов птиц.

Пример 25.

Для изготовления заявляемого средства, в качестве сырья использовали плацентарную ткань коров, которую обрабатывали так же, как и в примерах 1, 9 и 16.

Специфическую активность полученного целевого продукта определяли экспериментально по активации макрофагов перитонеального экссудата и нейтрофилов крови крыс, по сравнению с контролем. При использовании целевого продукта, полученного так же, как в примере 16, ферментативная активность макрофагов увеличивалась на $183,6 \pm 17,4\%$, а фагоцитарная активность макрофагов – на $131,4 \pm 11,8\%$. Для нейтрофилов крови эти показатели составляли $156,1 \pm 17,2\%$ и $111,2 \pm 12,3\%$, соответственно.

Целевой продукт, содержащий БАС в количестве 0,5 мас.%, а остальное – наполнитель, использовали в качестве лекарственного препарата для лечения коров, больных эндометритом в виде инъекций, которые осуществляли внутримышечно в дозе 0,05 мл/кг массы тела каждый 3-й день. Лечебный эффект проявлялся через 4-8 инъекций и его контролировали по параметрам воспалительной реакции.

Пример 26.

Для изготовления заявляемого средства в качестве сырья использовали жмых тимуса,

полученный после выделения из гомогената нерастворимых компонентов ткани, которые являются отходом производства тимозина.

Жмых тимуса обрабатывали так же, как и в примерах 1, 9 и 16.

Специфическую активность полученных целевых продуктов определяли экспериментально по стимуляции реакции бласттрансформации Т-лимфоцитов, которая увеличивалась на $212,4 \pm 15,5\%$ по сравнению с контролем, в случае использования целевого продукта, полученного так же, как и в примере 11.

Целевой продукт, содержащий БАС в количестве 0,5 мас.%, а остальное – наполнитель, использовали интраназально в качестве лекарственного препарата для профилактики инфекционных заболеваний человека. В каждую ноздрю вносили по 2 капли препарата с последующим массажем для растекания по слизистой. Процедуру повторяли 2 раза в день. Контроль эффекта осуществляли по общему состоянию организма и температуре тела.

Пример 27.

Лекарственный препарат на основе БАС, полученного так же, как указано в примерах 1-6, 9-14, 16-21 и 23-26, изготавливали с содержанием указанного БАС в препарате в количестве 0,001 мас.%. Наполнителем служил 10%-ный раствор сахарозы. Препарат использовали для подкормки пчел. Одноразовая подкормка в количестве 1 литра препарата на пчелиную семью обеспечивала по сравнению с контролем повышение: выживаемости на 100-160%; количества вылетов на 150-200%; медосбора на 35-85%.

Пример 28.

Лекарственный препарат на основе БАС, полученного так же, как указано в примерах 1-6, 9-14, 16-21 и 23-26, изготавливали после лиофильного высушивания указанного БАС с содержанием его в препарате в количестве 85,0 мас.%. Наполнителем служил натрий хлористый (NaCl). Препарат в виде присыпки из лиофильно высушенного порошка использовали для лечения открытых ран при ожогах, травмах и эрозии слизистой. Использование препарата ускоряло регенераторные процессы в 3-10 раз по сравнению с контролем.

Пример 29.

Лекарственный препарат на основе БАС, полученного так же, как указано в примерах 1-6, 9-14, 16-21 и 23-26, изготавливали с содержанием указанного БАС в препарате в количестве 1,0 масс.%. Наполнителем служил гель из растительной мякоти типа огуречного, яблочного и персикового пюре.

Препарат использовали для косметических целей. Лечебный эффект проявлялся после 2-6 сеансов и его контролировали по эластичности кожи.

Пример 30.

Лекарственный препарат на основе БАС, полученного так же, как указано в примерах 1-6, 9-14; 16-21 и 23-26, изготавливали с содержанием указанного БАС в препарате в количестве 1,0 мас.%. Наполнителем служил гель на основе меда (15 частей), сока лука репчатого (3 части), сока чеснока (1 часть) и репейного масла (1 часть). Препарат использовали в качестве маски для укрепления волосяного покрова. Гель накладывали на волосяной покров головы на 2-3 часа. Процедуру повторяли 1 раз в неделю. Лечебный эффект проявлялся после 3-10 сеансов и его контролировали по состоянию волосяного покрова.

Пример 31.

Лекарственный препарат на основе БАС, полученного так же, как указано в примерах 1-6; 9-14; 16-21 и 23-26, изготавливали с содержанием указанного БАС в препарате в количестве 0,1 мас.%. Наполнителем служил ланолин в смеси со спермацетом в соотношении 1:3. Препарат использовали в виде мази для восстановления кожного покрова после дерматоза. Использование препарата способствовало ускорению восстановительных процессов в 3-6 раз по сравнению с контролем.

Пример 32.

Лекарственный препарат на основе БАС, полученного так же, как указано в примерах 1-6; 9-14; 16-21 и 23-26, изготавливали с содержанием указанного БАС в препарате в количестве 0,1 мас.%. Наполнителем служило масло какао. Препарат использовали в виде свечей для лечения эндометритов. Лечебный эффект проявлялся на 10-20 день и его контролировали по показателям воспалительной реакции, гистологическим исследованием, анализу крови и выделениям.

Пример 33.

Лекарственный препарат на основе БАС, полученного так же, как указано в примерах 1-6; 9-14; 16-21 и 23-26, изготавливали с содержанием указанного БАС в препарате в количестве 1,0 мас.%. Наполнителем служила смесь линолина с вазелином в соотношении 1:3. Препарат использовали в виде мази для лечения эрозии слизистой и способствовал ускорению восстановительных процессов в 4-8 раз по сравнению с контролем.

Пример 34.

Аминокислотный анализ состава БАС, полученного так же, как в примерах 1-26,

проводили в трех направлениях, при которых определяли.

- общий аминокислотный состав;

5 - аминокислотный состав пептидов и свободных аминокислот в отсутствие кислотонерастворимых белков;

- состав свободных аминокислот.

1) Общий аминокислотный анализ БАС, полученного так же, как в примерах 1-26, проводили путем гидролиза средства в 6-ти нормальной соляной кислоте (6 N HCl) при температуре 110°C в течение 24 часов под вакуумом. По окончании гидролиза пробы упаривали под вакуумом над сухим едким натром (NaOH). Сухой остаток разводили в двудецинормальном (0,2 N) натрийцитратном буферном растворе pH 2,2 и наносили на ионнообменные колонки анализаторов аминокислот.

20 2) Для удаления кислотонерастворимых белков в 0,5 мл пробы добавляли 0,5 мл 3%-ной сульфосалициловой кислоты, оставляли на 1 час, в течение которого состав периодически помешивали. Денатурированные белки удаляли центрифугированием при ускорении 8000 g в течение 15-20 мин. Полученный супернатант подвергали общему аминокислотному анализу.

30 3) Содержание свободных аминокислот в БАС, полученном так же, как в примерах 1-26, определяли после уравнивания проб двудецинормальным (0,2 N) натрийцитратным буферным раствором при pH 2,2 и после фильтрации через бумажный обеззоленный фильтр наносили на ионнообменные колонки анализаторов аминокислот.

Элюцию аминокислот из колонок проводили натрийцитратными буферными растворами с pH 3,25; pH 4,25 и pH 5,28. Фракционированные аминокислоты обрабатывали нингидриновым реактивом определяли оптическую плотность на проточном фотометре на длине волны 440 и 570 нм.

Пример 35

45 Содержание общих липидов в БАС, полученном так же, как в примерах 1-26, определяли следующим образом. 0,5 мл БАС смешивали с 1,5 мл концентрированной серной кислоты (H₂SO₄) и кипятили при температуре 95°C в течение 15 мин. После остывания к 0,1 мл гидролизата добавляли 1,5 мл фосфованилинового реактива фирмы "Хемапол" (Чехо-Словакия) согласно известному методу определения общих липидов по специфической окраске (J.M.Knight, S.Anderson, J.M.Rawle - Clinical Chemistry - 1972, - 1972, - 18, - p.199). Оптическую плотность раствора определяли на длине волны 530 нм.

Пример 36.

Анализ нуклеотидного состава БАС, полученного так же, как в примерах 1-26, проводили следующим образом. Кислоторастворимые пуриновые и пиримидиновые нуклеотиды экстрагировали из 1,5-5,5 мл пробы 5%-ной охлажденной хлорной кислотой (HClO₄). Пробы после 20 мин экстракции на холоду центрифугировали при ускорении 2500 g в течение 10 мин, осадок трижды промывали 5%-ной хлорной кислотой (HClO₄), супернатанты объединяли и использовали для выделения кислоторастворимых нуклеотидов. Кислоторастворимую фракцию гидролизировали одномолярной хлорной кислотой (1M HClO₄) при температуре 100°C в течение 1 часа до пиримидиновых монофосфатов и пуриновых оснований. Растворы нейтрализовали едким калием (KOH) и продукты гидролиза разделяли на катионообменнике "ДАУЭКС" 50x4, используя ступенчатую элюцию: дистиллированной водой (H₂O) — для мочевой кислоты и уридинмонофосфата (УМФ); двудецимолярной хлорной кислотой (0,2 M HClO₄) — для ксантина и цитозин монофосфата (ЦМФ); четырехдецимолярной хлорной кислотой (0,4 M HClO₄) — для гипоксантина; одномолярной хлорной кислотой (1,0 M HClO₄) — для гуанина; двумолярной хлорной кислотой (2,0 M HClO₄) для аденина.

Нуклеотиды идентифицировали по хроматографической подвижности на катионообменнике в сравнении со стандартами, а также по спектрам поглощения в области 200-300 нм. Количество нуклеотидов определяли, используя величины коэффициентов молярной экстинкции.

Пример 37.

Иммуномодулирующую активность (свойства) БАС, полученного так же, как в примерах 1-26, определяли по активации макрофагов перитонеального экссудата крыс линии Wistar в опытах *in vitro*, по усилению ферментативной активности в восстановлении нитро-синего тетразолия в диформаза (НСТ-тест) и по усилению фагоцитарной активности к E. Coli.

В брюшную полость декапитированных животных с помощью иглы со шприцем вводили 20 мл бесцветного раствора Хенкса, содержащего 20 ед/мл гепарина. После 2-3-минутного массажа живота делали надрез и тем же шприцем отсасывали из полости введенную жидкость, которую после фильтрации через нейлоновый фильтр центрифугировали при ускорении 150-200 g в течение 15 мин. Полученный осадок суспендировали в половинном объеме свежей порции раствора Хенкса и вновь центрифугировали при

тех же условиях. Промывку выделенных клеток осуществляли 3-4 раза, после чего концентрацию клеток в суспензии доводили до 80×10^6 клеток/мл. Содержание макрофагов в тканевом экссудате всех клеток составляло 25-35%.

Определение ферментативной активности макрофагов перитонеального экссудата крыс проводили спектрофотометрически по восстановлению нитро-синего тетразолия в диформаза. Осадок клеток перитонеального экссудата крыс разводили бесцветным раствором Хенкса до концентрации 80×10^6 клеток/мл. К 50 мкл клеточной суспензии добавляли 50 мкл пробы с pH 7,4 и концентрацией пептидов 1,0 мг/мл. Смесь ставили на инкубирование при температуре 37°C в водяную баню при постоянном встряхивании в течение 30 мин, после чего добавляли 50 мкл насыщенного при температуре 20°C раствора нитро-синего тетразолия фирмы "Reanal" (Венгрия) и продолжали инкубировать еще 30 мин. Затем вносили 3 мл ацетона и центрифугировали при ускорении 2000 g в течение 20 мин. Надосадочную ацетоновую вытяжку фотометрировали при длине волны 515 нм.

В качестве контроля сравнения ферментативной активности использовали пробу с конзервантом на физиологическом растворе.

Фагоцитарную активность клеток перитонеального экссудата крыс определяли по их способности захватывать E. Coli.

К 50 мкл клеточной суспензии добавляли 50 мкл пробы с pH 7,4 и концентрацией пептидов 1,0 мг/мл. Смесь ставили на инкубирование при температуре 37°C в водяную баню при постоянном встряхивании в течение 30 мин. По окончании инкубации смесь суспендировали в 10 мл бесцветного раствора Хенкса при температуре 4°C и центрифугировали при ускорении 150-200 g в течение 15 мин. Осадок клеток перитонеального экссудата крыс разводили раствором Хенкса до концентрации $2,5 \times 10^6$ клеток/мл. Полученную суспензию в количестве 0,2 мл наносили на стекло размером 18x18 мм и инкубировали при температуре 37°C в течение 30 мин в атмосфере с 5%-м углекислого газа (CO₂) для прикрепления к стеклу макрофагов.

После инкубации для удаления неприкрепившихся клеток стекло ополаскивали 3 раза в стаканах со средой Хенкса. К оставшимся на стекле клеткам добавляли 0,2 мл суспензии E. Coli при концентрации 20×10^6 клеток/мл и инкубировали в тех же условиях 4 мин. В дальнейшем стекло вновь трижды ополаскивали, фиксировали метанолом и окрашивали по Романовскому-Гимзе.

Индекса фагоцитоза (ИФ) определяли по формуле:

$$\text{ИФ} = (0 + 2,5n + 6t + 9p + 10R) / \text{количество клеток}, \quad (1)$$

где 0 – количество клеток, не фагоцитирующих E.Coli;

n – количество клеток, поглотивших 1–4 клетки;

t – количество клеток, поглотивших 5–7 клеток;

p – количество клеток, поглотивших 8–9 клеток;

R – количество клеток, поглотивших 10 и более клеток E.Coli.

Идентификацию макрофагов проводили по окраске неспецифической эстеразы.

Пример 38.

Иммуномодулирующую активность (свойство) БАС, полученного так же, как в примерах 1–26, определяли по активации нейтрофилов крови крыс линии Wistar в опытах *in vitro* по усилению ферментативной активности в восстановлении нитро-синего тетразолия в диформаза (НСТ-тест) и по усилению фагоцитарной активности к E.Coli.

Кровь из хвостовой артерии крысы сразу же собирали в пробирки с бесцветным раствором Хенкса на гепарине и перемешивали. К полученной смеси добавляли 6%-ный декстран Т-500 в соотношении 3:1 и пробирки на один час ставили в холодильник. После оседания эритроцитов надосадочный слой лейкоцитов отбирали пипеткой и центрифугировали при ускорении 250 g в течение 15 мин удаление эритроцитов из лейкоцитарной массы осуществляли гемолизированием путем суспендирования осадка лейкоцитов в дистиллированной воде, после чего добавляли раствор Хенкса и смесь центрифугировали. Осадок лейкоцитов вновь суспендировали свежим раствором Хенкса и центрифугировали при тех же условиях. Операцию промывки лейкоцитов осуществляли 3 раза.

Определение ферментативной активности нейтрофилов крови проводили спектрофотометрически по восстановлению нитро-синего тетразолия в диформаза.

Осадок лейкоцитов крови крыс разводили бесцветным раствором Хенкса до концентрации 80×10^6 клеток/мл. К 100 мкл клеточной суспензии добавляли 300 мкл БАС, полученного согласно примерам 1–26, pH которого было доведено до 7,4 и концентрации пептидов – до 1,0 мг/мл. Смесь ставили на инкубирование при температуре 37°C в водяную баню при постоянном встряхивании в течение 30 мин, после чего добавляли 400 мкл раствора нитро-синего тетразолия фирмы "Reanal" (Венгрия) и даль-

нейшие операции проводили в той же последовательности, что и в примере 37.

Фагоцитарную активность лейкоцитов крови крыс определяли по их способности захватывать E.Coli.

После инкубации 500 мкл лейкоцитов с 50 мкл БАС, полученного так же, как в примерах 1–26, к суспензии клеток добавляли 10 мл бесцветного раствора Хенкса при температуре 4°C и центрифугировали при ускорении 150–200 g в течение 15 мин. Осадок лейкоцитов разводили в 0,3 мл раствора Хенкса и добавляли 0,05 мл суспензии E.Coli при концентрации 500×10^6 клеток/мл, а затем инкубировали 30 мин при температуре 37°C. После инкубации делали мазки, в которых после окраски количество фагоцитирующих клеток и индекса фагоцитоза (ИФ) подсчитывали так же, как указано в примере 37.

Пример 39.

Иммуномодулирующую активность (свойства) БАС, полученного так же, как в примерах 1–26, определяли в опытах *in vivo* на мышах линии BALB/C. Животным делали две подкожные инъекции препарата с интервалом два дня в дозе по 0,5 мл/кг массы животного при концентрации пептидов 1,0 мг/мл. Анализ иммуномодулирующих свойств проводили через двое суток после последней инъекции. В каждом опыте использовали не менее 10 животных. Контролем служили животные, обработанные по указанной схеме 0,08%-ным консервантом, растворенным в физиологическом растворе.

Для определения реакции бласттрансформации лимфоцитов в качестве Т-клеточного митогена был использован фитогемагглютинин (ФГА), а в качестве В-клеточного митогена – липополисахарид E.Coli (ЛПС). Лимфоциты, выделенные из селезенки мышей, инкубировали с данными митогенами в течение 72 часов при температуре 37°C в атмосфере с 5%-ми углекислого газа (CO₂). Уровень пролиферации клеток оценивали радиометрически по включению ³H-тимидина. Для этого к культурам добавляли ³H-тимидин ($3,7 \times 10^4$ Бк/пробу) и инкубировали в течение 3 часов. Затем пробы наносили на миллипоровые фильтры ("Синпор" № 5, ЧССР), трижды промывали средой 199, затем – 5%-ным раствором трихлоруксусной кислоты (ТХУ) и этанолом. Фильтры высушивали, помещали во флаконы со сцинтилляционной жидкостью ЖС-106 и определяли радиоактивность проб с помощью счетчика "Mark-111".

Пример 40.

Иммуномодулирующую эффективность (свойства) БАС, полученного так же, как в

примерах 1-26, определяли по стимуляции естественной киллерной активности спленоцитов мышей в опытах *in vivo*. Животным делали в течение двух дней две подкожные инъекции препарата в дозе по 0,05 мг/кг массы животного при концентрации в них пептидов 1,0 мг/мл. Анализ иммуномодулирующих свойств проводили на следующие сутки после последней инъекции. В каждом опыте использовали не менее 10 животных. Контролем служили животные, обработанные по указанной схеме 0,07%-ным консер-

вантом, растворенным в физиологическом растворе.

Состояние естественной киллерной активности спленоцитов определяли на клетках лимфомы мышей YAC-12, меченных изотопом хрома ^{51}Cr . Инкубацию проводили в течение 18 часов при соотношении клеток-мишеней и клеток эффекторов 1:25 (1×10^5 : $2,5 \times 10^6$ клеток). Специфическое высвобождение изотопа хрома ^{51}Cr , соответствующее цитотоксической активности эффекторных клеток, вычисляли по следующей формуле:

$$^{51}\text{Cr} \frac{(\text{высвобод. при эксперим.}) - (\text{самопроизв. высвобод.})}{(\text{максим. высвобод.}) - (\text{самопроизв. высвобождение})} \times 100, \quad (2)$$

где максимальное высвобождение обозначает радиоактивность, при которой все клетки лизированы. В качестве контроля для определения усиления естественной киллерной активности предлагаемым БАС применяли конзервант, растворенный в физиологическом растворе.

Пример 41.

Иммуномодулирующую эффективность (свойства) БАС, полученного так же, как в примерах 1-26, определяли по функциональной активности тимуса мышей в опытах *in vivo* в условиях, логичных примеру 39.

Эффект воздействия оценивали по титру тимического сывороточного фактора (ТСФ). Метод основан на способности гормонов вилочковой железы восстанавливать чувствительность спонтанных розеткообразующих клеток селезенки взрослых тимэктомированных мышей к антитимоцитной сыворотке.

Сыворотку крови опытных мышей пропускали через ультрафильтр системы GENTRIFLO CF-50A фирмы "Amicon". В реакции использовали по 0,1 мл цельной и серийно разбавленной средой 199 сыворотки. Контролем служила среда 199.

Селезенку брали у мышей через 10-14 дней после тимэктомирования. Из нее извлекали клетки путем разволокнения ткани препаративными иглами в среде 199. После фильтрования через капроновое сито их двукратно отмывали средой 199 центрифугированием при ускорении 4000 g. Осадок ресуспендировали в среде до концентрации 4×10^7 клеток/мл и получали таким образом взвесь в объеме 0,1 мл, которую прибавляли в пробирки с сывороткой и со средой 199. Содержимое пробирок перемешивали пипетированием и инкубировали при температуре 37°C в течение 60 мин.

После инкубации во все пробирки вносили по 0,1 мл антитимоцитной сыворотки и комплемента морской свинки в разбавлении

1:10. Взвесь инкубировали при температуре 37°C еще 30 мин. Затем к смеси прибавляли по 0,1 мл суспензии эритроцитов барана (12×10^7 клеток/мл), перемешивали, центрифугировали при ускорении 250 g в течение 5 мин и инкубировали 60 мин при температуре $4-8^\circ\text{C}$. Осадок в пробирках ресуспендировали в течение 5 мин. Подсчет розеток проводили в камере Горяева. За розетку принимали лимфоцит, присоединивший четыре и более эритроцитов. Титром ТСФ считали последнее разведение сыворотки, вызывающее 50%-ную редукцию числа розеткообразующих клеток (РОК) по отношению к контролю. Результаты выражали в виде логарифма титра при основании 2, то есть в виде $\log A$, где A — значение титра.

Пример 42.

Эффективность БАС, полученного так же, как и в примерах 1-26, которая проявляется в усилении репаративных способностей гепатоцитов печени крыс *in vivo* после подкожного введения четыреххлористого углерода (CCl_4), определяли по восстановлению активности Na, K-АТФазы следующим образом.

Крысам-самцам весом 230-250 г линии Wistar ежедневно в течение 4 дней подкожно вводили четыреххлористый углерод (CCl_4) в смеси с растворительным маслом в соотношении 1:1 в дозе 4,0 мг/кг массы животного. Через 4 часа после первой инъекции четыреххлористого углерода (CCl_4) опытным животным осуществляли первую из 4-х подкожных инъекций средства с интервалом в один день в дозе по 0,05 мг/кг массы тела животного. Эффективность средства регистрировали на следующий день после последней его инъекции. При этом в качестве контроля сравнения, использовали печень животных аналогично пораженную четыреххлористым углеродом (CCl_4), но без применения исследуемых БАС, а также печень интактных животных.

Для определения активности Na, К-АТФазы, использовали фракции клеточных мембран гепатоцитов. С этой целью 15 г охлажденной печени трех крыс гомогенизировали в 150 г одномиллимолярного боратного буферного раствора (1 мМ $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$) с рН = 7,5 в присутствии пятидецимиллимолярного раствора хлористого кальция (0,5 мМ CaCl_2), используя ручной стеклянный гомогенизатор с тефлоновым пестиком. Гомогенизированную смесь центрифугировали с ускорением 150 g при температуре 4°C в течение 10–12 мин. Супернатант подвергали повторному центрифугированию при ускорении 100 000 g в течение 20 мин, а полученный осадок 3 раза отмывали в 130 мл буфера при тех же условиях центрифугирования. По окончании отмывки осадок ресуспендировали в буферном растворе, доводя концентрацию белка, согласно методу SDS-Лоури, до 3,0 мг/мл, которую использовали в анализах.

Все операции получения фракции мембран проводили на холоду.

Активность Na, К-АТФазы плазматической мембраны гепатоцитов определяли в стандартной среде, состоящей из: шестидесятишестимиллимолярного хлористого натрия (66 мМ NaCl), тридцатичетырехмиллимолярного хлористого калия (34 мМ KCl), пятимиллимолярного хлористого магния (5 мМ MgCl_2), двадцатипятимиллимолярного (25 мМ) Трис- HCl , в которую перед началом опыта добавляли пятимиллимолярную аденозинтрифосфорную кислоту (5 мМ АТФ).

К 1,8 мл указанной стандартной среды добавляли 0,2 мл суспензии фракции мембран с концентрацией по белку 3,0 мг/мл и инкубировали при температуре 37°C в течение 15 мин, после чего реакцию останавливали, добавляя 0,6 мл 50%-го раствора трихлоруксусной кислоты (ТХУ). Смесь центрифугировали при ускорении 300–500 g в течение 15 мин. К 1,0 мл полученного супернатанта добавляли 4 мл двудецимолярного (0,2 М) ацетатного буфера с рН = 4,0, 0,5 мл 1%-ного раствора молибдатаммония в 1%-ном растворе серной кислоты (H_2SO_4), 0,5 мл аскорбиновой кислоты в 0,16%-ном растворе медного купороса (CuSO_4) и после перемешивания инкубировали 10 мин при температуре 25°C. Оптическую плотность определяли спектрометрически при длине волны 700 нм.

Активность Na, К-АТФазы вычисляли по разнице между активностями общей АТФазы и Mg-АТФазы. Для определения активности Mg-АТФазы проводили аналогичные исследования, однако вместо добавления 0,6 мл трихлоруксусной кислоты (ТХУ) в

смесь вносили 0,3 мл 0,05%-го раствора строфантина.

Установлено, что при токсическом поражении печени четыреххлористым углеродом (CCl_4) активность Na, К-АТФазы снижается в 3,5 раза, однако при использовании заявляемого БАС, как в примере 161, ее активность восстанавливается в эксперименте не менее чем на 80%, по сравнению с нормой. В этих же условиях известный гепатотропный препарат "Эссенциале" – промышленный аналог заявляемого препарата восстанавливает активность Na, К-АТФазы на $43,0 \pm 4,8\%$.

Пример 43.

Эффективность БАС, полученного так же, как и в примерах 1–26, которая проявляется в усилении репарационных способностей гепатоцитов печени крыс (*in vivo*) после подкожного введения четыреххлористого углерода (CCl_4), определяли по восстановлению активности в крови аминотрансфераз и концентрации калия (К) в гепатоцитах печени крыс следующим образом.

У животных, обработанных так же, как в примере 42, активность аминотрансфераз в крови проверяли по тест-системе фирмы "Хемапол" (Чехо-Словакия) согласно фотометрическому методу по специфической окраске (S.Reitman, S.Frankel, - American Journal of Clinical Pathology, - 1957 - 28–56).

К 0,25 мл раствора, содержащего децимолярный раствор (0,1 М) L-аспартата, двумиллимолярный (0,002 М) 2-оксоглутарата и децимолярный (0,11 М) фосфатный буферный раствор с рН = 7,4, добавляли 0,05 мл сыворотки крови крыс и инкубировали при температуре 37°C в течение 60 мин. По окончании инкубации в раствор добавляли 0,25 мл миллимолярного (0,001 М) 2,4-динитрофенилгидразин, растворенного в одномольной соляной кислоте (1 М HCl) и пробу оставляли на 20 мин при комнатной температуре, после чего добавляли 2,5 мл четырех децимолярного (0,4 М) едкого натра (NaOH), перемешивали и через 10 мин измеряли оптическую плотность на длине волны 520 нм против контрольного раствора, где вместо 0,05 мл сыворотки крови вносили 0,05 мл физиологического раствора.

При токсическом поражении печени четыреххлористым углеродом (CCl_4), сопровождающемся разрушением гепатоцитов и соответственно выходом аминотрансфераз, в связи с чем их активность в сыворотке крови повышается в 2 раза. В то же время использование заявляемого БАС, как в примере 16, позволяет полностью восстанавливать в эксперименте такую активность.

Известный гепатотропный препарат "Эссенциале" в тех же условиях восстанавли-

ливают активность в крови аминотрансфераз на 87.2–7.4%

Концентрацию калия (K^+) в гепатоцитах печени экспериментальных крыс определяли стандартным методом пламенной фотометрии, по Бриккеру, на пламенном фотометре марки ПФМ-1 (В.Н.Бриккер. Определение содержания K , Na методом пламенной фотометрии. – лабораторное дело – 1961 – 7 – с.3–6).

Установлено, что при токсическом поражении печени четыреххлористым углеродом (CCl_4) активность Na , K -АТФазы снижается в 3.5 раза, что сопровождается снижением концентрации K^+ в гепатоцитах печени крыс на 40%. В то же время использование заявляемого БАС, полученного так же, как в примере 16, позволяет восстанавливать концентрацию K^+ не менее чем на 55%. Известный препарат "Эссенциале" в тех же условиях восстанавливает концентрацию K^+ в гепатоцитах на 33.0–6.2%.

Пример 44.

Стимуляция регенераторных процессов при использовании БАС, полученного так же, как в примере 16 и препарата на его основе проводили на экспериментальной модели язвы желудка крыс, вызванной криогенным воздействием.

Крысам-самцам весом 190–200 г под эфирным наркозом производили лапаротомию верхней трети брюшной стенки, выводили желудок и вызывали повреждение его слизистой оболочки криогенным воздействием в течение 10 секунд охлажденным в жидком азоте металлическим стержнем диаметром 7 мм по известному методу (Вертелкин В.А. Криогенный способ формирования экспериментальной язвы желудка. – Пат. физиол. и эксперим. тер. – 1987, – № 2, – С.77–78). После этого желудок помещали в брюшную полость и рану зашивали. На 5-й день у животных образовывалась язва, морфологически подобная хронической язве человека, которая без лечения животных заживала на 3–4 неделе.

Эффективность регенераторных свойств заявляемого БАС и препарата на его основе определяли по ускорению процесса заживления ран по отношению к контрольной группе животных, не подвергавшихся лечению, а также в сравнении с эффектом, вызываемым известным биостимулятором "Солкосерил" фирмы Алколоид-Скопье (Югославия), выпускаемого по лицензии "Solco Basel" (Швейцария). Контроль процесса регенерации осуществляли биохимически на 5; 15; и 25 сутки после операции – по уровню в язве малонового диальдегида (МДА), патоморфологически – по срезам по-

раженного участка желудка, замерам площади поражения слизистой.

Уровень МДА в пораженной ткани желудка определяли при помощи тиобарбитуровой кислоты и рассчитывали его удельную концентрацию по отношению к 1 мг белка в пробе по известному методу (Стальная И.Д. Современные методы в биохимии. – М., 1977, – С.66–68).

Изучение воздействия на регенераторные процессы проводилось с использованием препарата, содержащего БАС в количестве 0,1 мас.%, а остальное – наполнитель, полученного так же, как в примере 16, а наполнителем служил сантимолярный фосфатный солевой буфер (0,01 M PBS) pH 7,2.

Начиная с пятого дня после операции, когда сформировалась язва, животным ежедневно в течение 20 дней делали внутримышечные инъекции по группам:

1) Контроль – (0,01 M BPS) в дозе 0,5 мл/кг,

2) Опыт – заявляемое БАС в дозе 0,5 мл/кг

3) Опыт – заявляемое БАС в дозе 0,05 мг/кг;

4) Лекарственный аналог – "Солкосерил" в дозе 0,5 мл/кг.

Интактная группа животных служила эталоном сравнения нормализации параметров гомеостаза.

В ходе проведения эксперимента было отмечено, что: на 15 день препарат на основе заявляемого БАС в дозе 0,05 мл/кг восстанавливал уровень МДА по сравнению с контрольной группой животных, не подвергавшихся лечению на $80 \pm 12\%$, и оставался выше интактных животных на $87 \pm 1,3\%$, а в дозе 0,5 мл/кг – нормализовал его до состояния интактных животных. В эти же сроки Солкосерил снизил уровень МДА на $38 \pm 16\%$ и не оказывал эффекта на 25 сутки, оставаясь на том же уровне, что и у контрольных животных, превышая уровень интактных животных на $21 \pm 9\%$. В опытных группах № 2 и № 3 на 25 сутки уровень МДА восстановился до нормы.

Аналогичные результаты были получены при патоморфологических исследованиях. На 5-е сутки после операции площадь повреждения слизистой желудка крыс составляла $13,0 \pm 1,0$ мм и на 15 сутки у контрольных животных уменьшалась до 9,5 мм.

В группе животных № 2 и № 3 к этому сроку границы зоны поражения смыкались, а в групп № 4 были размыты и слабо выражены.

При гистологических исследованиях срезов пораженных участков желудка отме-

чалось, что в группе № 2 деструктивные изменения выражены слабее, а репаративные процессы наступали раньше, чем у остальных групп животных.

Края язвы смыкались за счет возрастания промежуточной ткани и нехарактерного для данной области слизистой железистого эпителия. Дефект слизистой оболочки полностью замещался структурно-перестроенной железистой паренхимой, а гранулярная и зрелая соединительная ткани были умеренно выражены.

Для "Солкосерила" такой эффект проявлялся в меньшей степени и деструктивные нарушения отмечались не только в слизистой, но и в подслизистой оболочке пилороантральной части желудка. Встречались поля с продуктивной воспалительной реакцией, богатые клеточными элементами: фибробластами, плазматическими клетками, гистиоцитами и лейкоцитами. По этим признакам эта группа во многом проявляла сходство с контрольной группой животных.

Таким образом, экспериментальные данные такого характера указывают на способность заявляемого БАС стимулировать регенераторные процессы, при этом по эффективности он значительно превосходит промышленный аналог — широко известный регенераторный биостимулятор "Солкосерил".

Изобретение не ограничивается изложенными конкретными вариантами выполнения. Различные варианты могут быть осуществлены в пределах сущности и объема, охватываемых формулой изобретения.

Анализ состава и свойств заявляемого БАС и препарата на его основе

Идентификация заявляемого БАС среди других биологически активных средств возможна непосредственно по биохимическому анализу состава и опосредованно — по величине иммуномодулирующего эффекта, который проявляет заявляемое средство.

Установлено, что именно содержание модифицированных компонентов клеточных мембран с модифицированной антигенной структурой в составе заявляемого БАС обеспечивает существенное усиление иммунной реакции организма по сравнению с контролем. Это позволяет идентифицировать заявляемое БАС по следующему комплексу показателей:

а) По повышению активности макрофагов перитонеального экссудата крыс, а именно по усилению ферментативной активности макрофагов, контролируемому с помощью НСТ-теста, — не менее чем на 61% (при использовании в опытах нитро-синего тетразолия венгерской фирмы "Reanal") и по

усилению фагоцитарной активности E.Coli — не менее чем на 49%;

б) По повышению активации нейтрофилов крови крыс, а именно по усилению ферментативной активности, контролируемому по НСТ-тесту, — не менее чем на 75% (при использовании в опытах нитро-синего тетразолия венгерской фирмы "Reanal") и по усилению фагоцитарной активности E.Coli — не менее чем на 52%.

в) По усилению реакции бласттрансформации Т-лимфоцитов — не менее чем на 50%) и В-лимфоцитов — не менее чем на 71%;

г) По усилению функциональной активности тимуса — согласно содержанию в крови крыс тимического сывороточного фактора (ТСФ) — не менее чем на 234%;

д) По увеличению естественной киллерной активности спленоцитов крыс — не менее чем на 61%;

е) По увеличению способности стабилизировать плазматические мембраны гепатоцитов печени крыс после введения четыреххлористого углерода (CCl₄):

— по восстановлению активности Na, К-АТФазы — не менее чем на 30%;

— по восстановлению активности трансферазы в крови крыс — не менее чем на 61%;

— по восстановлению соотношения калия (К) и натрия (Na) в гепатоцитах печени крыс — не менее чем на 20%.

При этом, в качестве базы сравнения использовали контроль в виде вводимого в организм консерванта, растворенного в физиологическом растворе

Приведенная система показателей иммуномодулирующих и регенераторных эффектов (свойств) заявляемого БАС позволяет идентифицировать его по проявляемой биологической активности в качестве иммуномодулятора и стимулятора регенераторных процессов.

Для заявляемого БАС и препарата на его основе наблюдается выраженная тенденция к проявлению эффекта стимуляции регенераторных процессов и восстановления функциональной активности органов и тканей при различного рода патологиях, а также для лечения воспалительных процессов, где его эффективность может значительно превышать эффективность известных БАС и препаратов аналогичного назначения.

Так, активация репаративных процессов в условиях подострого поражения печени на модельной системе гепатита, оказывает защитное действие на плазматические мембраны гепатоцитов со значительным уменьшением синдрома цитолиза (концентрация аминотрансфераз при использовании БАС, полученного так же, как в

примере 16, повышается в крови не более чем на 5%, против 110–140% в контроле). Восстанавливается активность мембраносвязанных ферментов (Na, K-АТФаза) на 75–90% в сравнении с контролем, что в значительной степени нормализует внутри- и внеклеточное ионное равновесие K/Na. По этим показателям эффект воздействия заявляемого препарата превышает эффект воздействия широко известного гепатотропного препарата "Эссенциале", для которого они составляют соответственно 7–20% и 38–48% (примеры 10, 20). Препарат на основе заявляемого БАС значительно превосходит "Эссенциале" также и по способности нормализовать концентрацию билирубина, показатели липидного обмена.

Препарат на основе заявляемого БАС ингибирует процессы перекисного окисления липидов на мембранах гепатоцитов интоксцированных животных и повышает активность глутатионзависимой антиоксидантной системы в крови, не изменяя при этом активность ферментов микросомного окисления печени и содержание цитохрома P-450.

Заявляемое БАС в значительной степени активирует не только репаративные, но и регенераторные процессы, способствующие восстановлению массы органа и замещению погибших клеток пролиферирующими клетками из оставшейся части органа.

Так, в эксперименте по активации процессов регенерации печени крыс после частичной гепатэктомии было установлено, что четыре инъекции препарата на основе БАС, полученного так же, как в примере 16, введенные животным до операции с интервалом в 2 дня, существенно стимулировали скорость процессов транскрипции, а также выраженность активации ДНК-полимеразного комплекса ядер гепатоцитов. Заявленный препарат активизирует ДНК-полимеразу В, ответственную за репарацию генетического аппарата клетки, а при процессах пролиферации стимулирует активность ДНК-полимеразы А, ответственную за репликацию. Это позволяет значительно повысить скорость пролиферации клеток и темп восстановительных процессов при регенерации клеток и темп восстановительных процессов при регенерации печени.

Значимость такого эффекта следует оценивать с учетом того обстоятельства, что данная модельная система достаточно жестко генетически детерминирована и крайне трудно поддается какой-либо активации.

Активизированные заявляемым БАС внутриклеточные процессы способствуют

нормализации функциональных показателей при патологических процессах, не нарушая при этом функционального состояния и структуры печени у интактных животных.

Данное явление в значительной степени основывается на существенном влиянии в реализации восстановительных процессов иммунной системы организма и, прежде всего, системы мононуклеарных фагоцитов (СМФ), где определяющую роль играют тканевые макрофаги. Для печени такими макрофагами являются Купферовские клетки, которые контролируют регенераторные и репаративные процессы в органе.

Для их стимуляции достаточно нескольких инъекций препарата. После этого уже на следующие сутки отмечается генерализованная реакция всех клеток СМФ и в первую очередь Купферовских клеток, на что указывает увеличение скорости удаления чужеродных веществ из кровяного русла. Повышается антибактериальная активность и завершенность фагоцитоза перитонеальных макрофагов и нейтрофилов крови, что может иметь существенное значение для лечения и профилактики бактериальных инфекций, а также воспалительных процессов.

Эффект стимуляции регенераторных процессов заявляемым БАС и препаратами на его основе проявляется также при лечении язв, ран, кожного покрова при ранениях и поражениях. В этом отношении их эффективность превосходит аналогичные показатели для его промышленного аналога — известного регенераторного биостимулятора "Солкосерил" (пример 44).

Использование заявляемого средства и препарата на его основе дало положительные результаты при введении в организм животных при лечении воспалительных процессов. Так, при лечении экспериментально вызванного пролиферативного воспаления на модели "карманной" гранулемы по Селле в модификации Розена (Методика воспроизведения стандартного асептического воспаления. — Пат. физиол. и эксперим. тер., — 1961, — 5, № 6, с. 72–76) препарат на основе заявляемого БАС в два раза эффективнее "Солкосерила" угнетал формирование грануляционно-фиброзной ткани и образование экссудата.

При лечении маститов у коров выздоровление наблюдалось в 80–93% случаев, в то время как при использовании известных БАС, как и при использовании антибиотиков в сочетании с противовоспалительным препаратом "Мастисан", выздоровление наблюдалось не более чем в 70% случаев, а при спонтанном излечивании в контрольной группе — в пределах 53–63% случаев. При

лечении воспаления легких у телят получены следующие результаты: при использовании заявляемого БАС выздоровление наступает в 85–95% случаев; при использовании известных БАС – в 69% случаев; при лечении антибиотиками и препаратом "Бовиверекс" – в 60–70%; в контрольной группе – в 48–61% случаев. При лечении эндометритов коров выздоровление наблюдалось в 80–95% случаев, в то время как при использовании известных БАС так же, как и антибиотиков с препаратом "Окситоцин", выздоровление наблюдалось не более чем в 70% случаев.

В процессе эксперимента иммуномодулирующие и регенераторные свойства известных и заявляемого БАС были определены в соответствии с комплексом показателей, идентифицирующих исследуемые объекты. Результаты эксперимента сведены в таблицу 6, в которой указаны количественные показатели эффектов известного БАС № 1, полученного по технологии, описанной в [2] и БАС № 2, представленного на основе опубликованных в [6] данных, и заявляемого БАС, представленного в виде групп:

WS – обобщенных по результатам примеров 1–4 (компоненты клеточных мембран);

PM – примеров 5–6 (компоненты плазматических мембран);

TS – примеров 9–14 (термостабильные компоненты клеточных мембран);

LM – примеров 16–19 (низкомолекулярные компоненты клеточных мембран $M \leq 10,0$ кДа);

CW – примеров 20–21 (углеводсодержащие низкомолекулярные компоненты клеточных мембран) соответственно.

В качестве контрольного объекта использовался физиологический раствор натрия хлористого, содержащий консервант. Полученные результаты сведены в таблицу 6 и сравнительно характеризуют заявляемое и известные БАС.

Приведенные результаты касаются характеристик заявляемого БАС, полученного в виде смеси не установленной структуры, а также необходимых для его идентификации сведений об эффектах, обуславливающих его назначение.

Наряду с возможностью идентифицировать заявляемое БАС анализ данных таблицы 6 позволяет оценить конкретный результат, обеспечиваемый заявляемым БАС и заключающийся в существенном улучшении свойства биологической активности в виде количественного показателя за счет наличия в нем компонентов клеточных мембран с модифицированной структурой,

влияние которых в известных БАС не выявлено.

Из анализа данных таблицы 6, кроме того, следует, что иммуномодулирующий эффект заявляемого БАС существенно возрастает в тех случаях, когда оно содержит компоненты плазматических клеточных мембран (БАС – PM), компоненты клеточных мембран в виде термостабильных компонентов (БАС – TS), а также в виде низкомолекулярных компонентов (БАС – LM) и в виде углеводсодержащих компонентов (БАС – CW), причем нарастание указанного эффекта в этом ряду идет слева направо.

Свойства заявленного БАС и препарата на его основе находятся в тесной зависимости от его состава.

Как показывают результаты биохимического анализа (таблица 7), БАС содержит в своем составе в основном такие органические соединения, как полипептиды, пептиды, аминокислоты, связанные и свободные углеводы, липиды, нуклеотиды и другие соединения. Данные таблицы 7 показывают распределение по массе органических соединений в составе БАС при использовании в качестве исходного сырья эмбриональной ткани крупного рогатого скота. Кроме того, в таблице 7 отражены результаты получения разновидностей заявленного БАС (WS, PM, TS, LM, CW) последовательно всеми заявленными способами. Помимо результатов осуществления способа, который обеспечивает получение БАС – WS и при осуществлении которого в качестве сырья используют животную ткань, взятую на стадии процесса модификации антигенной структуры клеточных мембран ткани с приведенными выше процессами, таблица 7 включает также результаты осуществления способа получения заявляемого БАС с модифицированными компонентами плазматических клеточных мембран (БАС – PM), с компонентами в виде термостабильных компонентов (БАС – TS), в виде низкомолекулярных компонентов (БАС – LM), а также углеводсодержащих компонентов клеточных мембран (БАС – CW), преимущественно в виде гликопептидов, гликолипидов, олигоуглеводов, нуклеотидов и/или свободных моноуглеводов.

Данные таблицы 7 позволяют провести сравнительный анализ результатов осуществления заявленного и известного способов.

Сравнительный анализ (таблицы 6 и 7) показывает, что специфическая активность в виде количественных показателей эффекта БАС зависит от их состава: в известных БАС соотношение ингредиентов состава не обеспечивает требуемого эффекта, в то время как

соотношение ингредиентов в заявляемом БАС существенно повышает специфическую активность.

Характерной особенностью биохимического состава заявляемого БАС является наличие в нем углеводсодержащих компонентов, в значительной степени определяющих антигенную структуру клеточных мембран ткани при процессах модификации. Именно поэтому содержание углеводов в наиболее активных фракциях (фракции 3, 4 и 5 в таблице 4) низкомолекулярных компонентов клеточных мембран с молекулярной массой $M = 0,8-10$ кДа (олигоуглеводы, гликопептиды, гликолипиды, нуклеотиды) является определяющим при идентификации и характеристике заявляемого БАС. Существенным показателем в этом отношении является соотношение содержания углеводов и пептидов в компонентах с молекулярной массой $M = 0,08-10$ кДа (таблицы 2 и 7), которое определяют по формуле:

$$G = \frac{C_y}{C_n} \quad (3).$$

где C_y и C_n — концентрации соответственно углеводов и пептидов компонентов с молекулярной массой $M = 0,8-10,0$ кДа.

Для заявляемого БАС величина этого показателя лежит в пределах $G_3 = 0,6-2,0$, в то время как для известных БАС величина этого показателя не превышает значения $G_{из} < 0,25$.

Таким образом, величина показателя G обобщенно характеризует свойство продуктов гидролиза и зависит от применяемого в заявляемом способе сырья, от совокупности операций способа обработки указанного сырья и режимов осуществления процессов гидролиза.

Следует отметить, что эффективность целевого продукта зависит от температурно-временных характеристик процесса гидролиза и эта зависимость может быть выражена графически (смотреть чертеж). Представленные на чертеже кривые 1, 2 и 3 иллюстрируют изменение величины эффективности заявляемого БАС в зависимости от продолжительности t операции гидролиза, выполняемой при различных значениях рабочей температуры T_r , так что $T_{r1} > T_{r2} > T_{r3}$.

Для кривой 2 в интервале времени от $t = 0$ до $t = t_2$ величины эффективности \mathcal{E} заявляемого БАС как совокупности показателей его специфической активности увеличивается от $\mathcal{E} = 0$ до $\mathcal{E} = R_{max}$, что объясняется относительным увеличением в процессе гидролиза доли низкомолекулярных углеводсодержащих компонентов с молекулярной массой $M_{yl} = 0,8-10,0$ кДа в составе

целевого продукта при одновременном снижении доли высокомолекулярных, иммуноингибирующих и балластных соединений.

В интервале времени от $t = t_2$ до $t = t_4$ эффективность уменьшается от $\mathcal{E} = R_{max}$ до $\mathcal{E} = 0$ вследствие того, что продолжение процесса гидролиза приводит к изменению структуры углеводсодержащих компонентов с молекулярной массой $M = 0,8-10,0$ кДа, и прежде всего гликопептидов, в связи с гидролизом их пептидной основы, связывающей несколько олигоуглеводных цепей, а также вследствие модификации самих олигоуглеводов или появления неактивных мономерных форм.

Описанные выше процессы температурозависимы и имеют ярко выраженный максимум, который суммарно (в итоге) выражается максимумом соответствующих кривых 1, 2 и 3, то есть скоростью протекания указанных процессов и, соответственно, константы скорости указанных химических реакций сильно зависят от величины рабочей температуры T_r в указанном температурном интервале, в котором обеспечивается сохранение функциональной активности ферментов, с помощью которых осуществляется гидролиз исходного сырья. При повышении температуры T_r максимумы кривых 1, 2 и 3 сдвигаются влево, в сторону начала координат. Поэтому выбор рабочей температуры, точнее диапазона рабочих температур, должен одновременно с этим сопровождаться и выбором интервала времени протекания процесса гидролиза, а именно такого временного интервала, в котором значение эффективности \mathcal{E} имеет величину не менее $0,8 R_{max}$, то есть

$$\mathcal{E} \geq 0,8 R_{max} \quad (4)$$

Выбор исходного сырья, продолжительность процесса гидролиза и поддержание рабочей температуры, а также возможность его фиксированного окончания позволяют обеспечить необходимую, сравнительно более высокую эффективность \mathcal{E} заявляемого БАС по сравнению с известными БАС.

Кроме того, перечисленные условия позволяют обеспечить воспроизводимость результатов, т.е. позволяют стандартизировать получение заявленного БАС с заданными свойствами, а именно с заданной фиксированной специфической активностью.

Экспериментально установлено, что иммуномодулирующие свойства заявляемого БАС, в частности, повышение активности макрофагов перитонеального экссудата крыс *in vitro*, зависят от температурно-временных характеристик процесса гидролиза в диапазоне рабочих температур $T_r = 4-45^\circ\text{C}$. Выбор рабочей температуры в указан-

ном диапазоне осуществляют, исходя из следующих данных

при температуре $T_p < 4^\circ\text{C}$ значительно возрастает продолжительность процесса гидролиза, что снижает экономическую эффективность заявляемого способа.

при температуре $T_p > 45^\circ\text{C}$ происходит снижение активности ферментов, обеспечивающих гидролиз сырья, и ускоряются процессы распада активных компонентов целевого продукта. В результате снижается качество целевого продукта и падает экономическая эффективность заявляемого способа.

Следует отметить, что эффективность заявляемого БАС во многом зависит не только от наличия в нем необходимой действующей субстанции, но и от всего состава целевого продукта, а, следовательно, и от способа его производства, что указывает на многоплановость оценки качества получаемого средства

Наибольший вклад в иммуномодулирующий эффект вносят углеводсодержащие компоненты в составе фракции (3, 4 и 5 в таблице 4), молекулярная масса которых $M_{\text{ун}} = 0,8-10,0$ кДа (олигоуглеводы, гликопептиды, гликолипиды, нуклеотиды). В дальнейшем условно обозначим их как олигоуглеводы (Оу). Однако следует учитывать, что влияние указанных олигоуглеводов на иммуномодулирующее свойство заявляемого БАС является достаточно сложным и коррелирует с несколькими эффектами

Так, экспериментально обнаружено, что величина показателя, обобщенно отражающего величину эффективности, выражается следующим соотношением.

$$R = F(A + B + C) \quad (5)$$

где R – показатель, обобщенно характеризующий величину эффективности как совокупность показателей специфической активности;

F – коэффициент, характеризующий степень модификации компонентов клеточных мембран животной ткани, используемой в качестве сырья;

A, B, C – функциональные характеристики соотношений ингредиентов в составе БАС. При этом:

A – относительная концентрация углеводов, входящих в состав компонентов, с молекулярной массой $M = 0,8-10$ кДа (Оу), по отношению к остальным ингредиентам БАС, то есть

$$A = \frac{Oy}{PP + P + Amk + Pu + Oy + My + Gl + L + H} \quad (6)$$

B – относительная концентрация Оу по отношению к ингредиентам с молекулярной массой $M > 0,8$ кДа, то есть

$$B = \frac{Oy}{PP + P + Pu + Oy + Gl} \quad (7)$$

C – относительная концентрация Оу по отношению к ингредиентам с молекулярной массой $M > 10$ кДа, то есть

$$C = \frac{Oy}{PP + Pu + Oy} \quad (8)$$

где концентрация ингредиентов БАС выражается через:

Оу – "олигоуглеводы", то есть углеводы, входящие в состав компонентов, имеющих молекулярную массу $M = 0,8-10$ кДа;

Пу – "полиуглеводы", то есть углеводы, входящие в состав компонентов, имеющих молекулярную массу $M > 10$ кДа;

Му – "моноуглеводы", то есть углеводы в виде мономеров или в составе компонентов, имеющих молекулярную массу $M < 0,8$ кДа;

ПП – "полипептиды", имеющие молекулярную массу $M > 10,0$ кДа;

П – "пептиды", имеющие молекулярную массу $M < 10,0$ кДа;

Амк – свободные аминокислоты;

Гл – гликолипиды;

Л – липиды,

Н – нуклеотиды.

Согласно уравнению (5) величина показателя R зависит не только от природы исходного сырья, используемого для получения БАС и характеризуемого величиной коэффициента F , но и от способа получения БАС, определяющего величину суммы

$$A + B + C = K \quad (9)$$

Тогда уравнение (5) приобретает вид

$$R = F K \quad (10)$$

где K – коэффициент, характеризующий величину эффективности, заявляемого БАС, полученного согласно заявленному способу.

Как можно видеть из уравнений (3-8), величина показателя K в значительной степени зависит от концентрации олигоуглеводов Оу и высокомолекулярных компонентов ПП и Пу, значения которых представлены во всех слагаемых уравнений. Однако вклад этих компонентов в специфичность БАС разнонаправленный, и значение величины коэффициента K возрастает по мере увеличения концентрации олигоуглеводов Оу и уменьшения концентрации высокомолекулярных компонентов полипептидов ПП и полиуглеводов Пу.

Наконец, из этого следует вывод, что наиболее существенное относительное улучшение иммуномодулирующего свойства заявляемого БАС обеспечивается в частных случаях выполнения заявленного способа получения этого БАС. Это можно объяснить тем, что по мере прохождения каждой из последующих стадий заявленного способа увеличивается концентрация олигоуглево-

дов Оу в заявляемом БАС и уменьшается содержание в нем высокомолекулярных соединений полипептидов ПП и полиуглеводов Пу

Данные такого характера хорошо согласуются с результатами анализа ингредиентов заявляемых и известных БАС, значения которых приведены в таблице 7

Из таблиц 2 и 7 видно, что значение показателя К у известного БАС существенно ниже, чем у заявляемого. При этом величина К хорошо коррелирует с содержанием олигоуглеводов Оу и высокомолекулярных соединений (ПП + Пу).

Так, для известного БАС № 1 [2] концентрация олигоуглеводов составляет Оу = 3,0%, а концентрация высокомолекулярных соединений составляет ПП + Пу = 34,0% и значение показателя К составляет $K = 0,168$. В то время как у заявляемого БАС величины аналогичных показателей концентраций составляют соответственно Оу = 0,468 - 1,897. Для БАС, полученного из углеводсодержащих компонентов значение концентрации Оу = 49,7%, а ПП + Пу менее 0,5% и значение показателя составляет $K = 2,197$.

Таким образом, иммуномодулирующее свойство заявляемого БАС, как это следует из анализа данных таблиц 2 и 7, существенно выше, чем у известного БАС. Анализ данных позволяет сделать также вывод о том, что при использовании одного и того же сырья, и, следовательно, при одном и том же значении коэффициента F, эффективность R заявляемого БАС коррелирует с величиной показателя К у целевых продуктов, получаемых различными вариантами заявляемого способа. Этот вывод подтверждается результатами испытаний (таблицы 1 и 6).

Так, ферментативная активность макрофагов перитонеального экссудата крыс, согласно НСТ-тесту (см. таблицу 6), повышается по сравнению с контрольными группами для водорастворимых компонентов заявляемого БАС на 70%, а для низкомолекулярных компонентов - на 170%, то есть технический результат по этому показателю специфической активности увеличивается в 2,4 раза. Аналогично этому улучшается в 2,5 раза также технический результат по фагоцитарной активности макрофагов. Данные такого характера хорошо коррелируют с величиной коэффициента К для каждого из этих продуктов, которые различаются в 2,6 раза.

Таким образом, достигаемый сравнительно более высокий технический результат, касающийся специфической активности заявляемого БАС, находится в причинно-следственной связи с совокупностью его

признаков. Так специфическая активность заявляемого БАС во всех случаях нарастает при увеличении количества реализованных признаков заявляемого БАС (в таблице 6 - слева направо)

Изобретения, касающиеся БАС, способа его получения и лекарственного препарата на основе заявляемого БАС основаны на выборе исходного сырья, выбора условий протекания процесса и получения БАС препарата с гарантированной высокой специфической активностью. При этом выбранная технология получения БАС обеспечивает воспроизводимость результатов, то есть позволяет стандартизировать получение заявленного БАС с заданными свойствами, а именно с заданной фиксированной иммуномодулирующей активностью, определяющей фармакологический, терапевтический и общебиологический эффекты при использовании изобретения.

Получаемые целевые продукты в общем и частных случаях выполнения заявляемого способа получения БАС равноценны по характеру своего биологического воздействия, но отличаются по своей специфической активности. Поэтому целесообразность использования того или иного конкретного биологически активного средства определяется требованиями, предъявляемыми объектом, для которого они предназначены, то есть требованиями ветеринарии и/или медицины. В связи с этим в каждом конкретном случае использования целевого продукта выбор того или иного варианта БАС определяется соотношением требований к его иммуномодулирующей активности и эффективности в целом со стоимостью (экономичностью) его получения. В частности, высокая эффективность средства, содержащего низкомолекулярные компоненты с молекулярной массой $M \leq 10,0$ кДа заявляемого (БАС - LM), а так же углеводсодержащие компоненты (БАС - CW) в полной мере проявляется в повышении активности макрофагов, нейтрофилов, лимфоцитов, естественных киллеров, что обеспечивает усиление регенераторных процессов (таблица 6). Для сельскохозяйственных животных такие эффекты сопровождаются увеличением дополнительных привесов животных при интенсивном откорме (таблица 8). При лечении респираторных и инфекционных заболеваний (парагрипп) такое преимущество не столь существенно и здесь экономически целесообразно применять БАС, содержащее водорастворимые компоненты клеточных мембран (БАС - WS и БАС - PM). При лечении воспалительных процессов (маститы, эндометриты и тому подобное) выгоднее исполь-

зовать средство содержащее термостабильные компоненты заявляемого (БАС - TS)

При приготовлении препаратов для наружного использования в виде мазей, гелей, компрессов, свечей, интраназально или для выпойки животных вместо (БАС - LM) экономически целесообразно применять БАС, содержащее термостабильные компоненты (БАС - ST).

При этом для получения максимального эффекта заявляемое БАС и препараты на его основе целесообразнее использовать для активации и стимуляции регенераторных процессов и восстановления функциональной активности органов и тканей при различного рода патологиях, а также для лечения воспалительных процессов, где его эффективность может значительно превышать эффективность известных БАС и препаратов аналогичного назначения.

Кроме того, заявляемое БАС и препараты на его основе являются эффективным средством при лечении инфекционных заболеваний (парагрипп, ОРЗ и тому подобное) При его использовании выздоровление молодняка крупного рогатого скота наблюдалось в 88-95% случаев, тогда как при использовании известных БАС в тех же условиях, так же как и антибиотиков и препарата "Бовиверекс", выздоровление животных наблюдалось не более чем в 70% случаев а при спонтанном излечивании в контрольной группе - в пределах 58-67% случаев

Заявляемое БАС повышает резистентность животных к инфекционным заболеваниям, значительно снижает тем самым уровень падежа поголовья

Использование применяемого БАС для профилактики снижало уровень заболевания телят парагриппом до 5%, в то время как при использовании известных БАС уровень заболеваемости животных достигал 12-17%, а в контрольной группе - 22-28%.

Нормализация общебиологического состояния сельскохозяйственных животных при использовании заявляемого БАС способствует улучшению производственных показателей и, в частности, увеличению дополнительных привесов живой массы без снижения качества мяса, приближая эти показатели к генетически запрограммированному уровню при интенсивном откорме. Данная особенность выгодно отличает БАС и препараты на его основе от гормональных и других стимуляторов роста, которые, повышая количественные показатели, негативно влияют на гомеостаз животных и снижают качество продукции.

Введение заявляемого БАС и препаратов на его основе в организм животного, имеющего отклонения параметров гомеостаза от нормы, обеспечивало при интенсивном откорме увеличение дополнительного привеса в среднем на 52-145% от привеса в контрольной не обработанной заявляемым БАС группе В то время, как при использовании в тех же условиях известных БАС - аналогов (средства № 1) дополнительный привес по сравнению с привесом в контрольной группе составлял в среднем 12-24%. Контрольную и экспериментальную группы крупного рогатого скота формировали из 14-18 телят одного возраста и, в среднем, одного и того же стартового веса и этиологии отклонения от нормы

Нормализация параметров гомеостаза способствует также увеличению:

- надоев молока крупного и мелкого рогатого скота,

- яйценоскости домашней птицы;

- качества меха пушного зверя;

- выживаемости молодняка,

- медосбора пчел и тому подобное.

Заявляемое БАС нетоксично, не вызвало побочных эффектов (аллергия и тому подобное).

Экспериментально установлено отсутствие побочных эффектов при использовании заявляемого БАС и препарата на его основе

Сравнительные данные по фармакологическому, терапевтическому и общебиологическому эффекту от использования на животных заявляемого БАС и препарата на его основе приведены в таблице 8. Анализ данных этой таблицы показывает, что биологическая активность заявленного БАС значительно превышает величину биологической активности аналогов.

Таким образом, заявляемое БАС и препарат на его основе обладают широким спектром применения в ветеринарии и медицине и могут быть использованы для нормализации физиологического состояния организма при лечении заболеваний, контроль над которыми осуществляется в рамках компетенции иммунной системы организма.

Введение в организм заявляемого БАС в виде заявляемого препарата позволяет стимулировать:

- функциональную активность печеночной ткани при гепатите,

- регенерацию печени после гепатэктомии,

- заживление язв, ран, кожного покрова при ранениях и травмах,

- восстановление формулы крови при кровопотерях

Продолжение таблицы 1

Иммуномодулирующие и регенераторные эффекты биологически активных средств (БАС)		Количественный показатель эффектов БАС в примерах						
		N 1	N 2	N 3	N 5	N 9	N 11	N 13
6. Усиление репарационных способностей гепатоцитов крыс по восстановлению активности после введения CCl_4 , %, по сравнению с контролем	Na, K-АТФ-азы	34,2	40,5	30,3	57,4	60,8	49,2	63,4
	аминотрансфераз крови	70,7	81,9	61,3	92,4	93,5	86,8	96,0
	концентрации K^+ в гепатоцитах	24,6	30,1	20,7	42,6	44,1	35,8	46,6

Продолжение таблицы 1

Иммуномодулирующие и регенераторные эффекты биологически активных средств (БАС)		Количественный показатель эффектов БАС в примерах				
		N 16	N 17	N 18	N 20	N 21
1. Повышение активности макрофагов перитонеального экссудата крыс, %, по сравнению с контролем	ферментативной активности (НСТ-тест)	173,1	144,1	201,5	200,1	224,7
	фагоцитарной активности по E. Coli	154,2	121,8	185,4	171,7	200,9
2. Повышение активности нейтрофилов крови, %, по сравнению с контролем	ферментативной активности (НСТ-тест)	149,1	129,0	168,4	161,0	181,6
	фагоцитарной активности по E. Coli	104,2	85,8	120,6	113,6	129,2
3. Стимуляция реакции бластотрансформации по сравнению с контролем, %	T-лимфоцитов	132,5	111,4	152,0	160,3	191,9
	B-лимфоцитов	193,6	163,9	220,9	224,7	262,5
4. Увеличение титра тимического сывороточного фактора (ТСФ), %, по сравнению с контролем		766,2	649,7	858,9	889,8	1007,6
5. Стимуляция естественной киллерной активности спленоцитов крыс, %, в сравнении с контролем		145,2	117,2	170,0	182,0	212,2

- извлечение воспалительных заболеваний (маститы, воспаление легких, эндометриты).

- излечение инфекционных заболеваний (парагрипп ОРЗ).

- повышение резистентности животных к инфекционным и воспалительным процессам;

- улучшение общебиологического состояния организма;

- увеличение привесов животных.

Практическое применение заявляемого БАС подтвердило его нетоксичность и отсутствие побочных отрицательных эффектов - 15
аллергию, гиперчувствительность замедленного типа.

Отсутствие побочных эффектов при использовании БАС и лекарственного препарата на его основе и данные по фармакологическому, терапевтическому и общебиологическому воздействию на организм животного определили возможность клинической апробации БАС и препарата.

10 При обследовании группы пациентов определено положительное воздействие на физиологическое состояние организма, а также практически полная аналогия экспериментальным доклиническим исследованиям на животных.

Способ получения заявляемого БАС может быть реализован как в лабораторных, так и в промышленных условиях.

Таблица 1

Иммуномодулирующие и регенераторные эффекты биологически активных средств (БАС)		Количественный показатель эффектов БАС в примерах						
		N 1	N 2	N 3	N 5	N 9	N 11	N 13
1. Повышение активности макрофагов перитонеального экссудата крыс, %, по сравнению с контролем	ферментативной активности (НСТ-тест)	69,7	79,1	61,3	102,	110,	86,8	118,
	фагоцитарной активности по E. Coli	60,2	73,5	49,3	90,4	98,7	77,7	107,
2. Повышение активности нейтрофилов крови, %, по сравнению с контролем	ферментативной активности (НСТ-тест)	82,7	93,7	74,9	116,	124,	102,	131,
	фагоцитарной активности по E. Coli	60,5	70,1	52,1	78,4	81,3	67,5	85,9
3. Стимуляция реакции бласт трансформации по сравнению с контролем, %	Т-лимфоцитов	57,1	64,8	52,4	83,5	87,4	65,8	10,6
	В-лимфоцитов	75,4	85,9	69,3	119,0	126,1	100,4	137,2
4. Увеличение титра тимического сывороточного фактора (ТСФ), %, по сравнению с контролем		302,6	387,4	234,5	497,2	433,7	426,3	567,5
5. Стимуляция естественной киллерной активности спленоцитов крыс, %, в сравнении с контролем		69,3	81,3	61,9	99,2	106,	89,2	114,

Продолжение таблицы 2

Органические соединения	Содержание органических соединений масс. % в БАС полученных по примерам				
	N 16	N 17	N 18	N 20	N 21
Полипептиды	м е н е е 0,3				
Пептиды	27,7	33,3	27,7	36,0	28,7
И Т О Г О :	28,0	33,6	28,0	36,3	29,0
Аминокислоты	31,5	24,0	16,5	менее 0,5	
Углеводы в составе: -высокомолекулярных соединений с молекулярной массой $M > 10,0$ кДа -низкомолекулярных соединений с молекулярной массой $M = 0,8 + 10,0$ кДа -свободных мономеров или соединений с молекулярной массой $M < 0,8$ кДа	м е н е е 0,2				
	23,2	20,0	30,8	41,4	57,9
	8,5	6,7	6,9	16,1	11,9
И Т О Г О :	31,9	26,9	37,9	57,7	70,0
Липиды, нуклеотиды и др органические соединения	8,6	15,5	17,0	5,5	0,5
В С Е Г О :	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
Соотношение содержания углеводов и пептидов, G	0,84	0,60	1,20	1,15	2,00
Расчетный коэффициент эффективности, K	1,60	1,47	1,90	1,90	2,20

G и K - Коэффициенты, характеризующие относительное содержание углеводов в соединениях с молекулярной массой $M = 0,8 + 10,0$ кДа:

- по отношению к пептидам (G) и
- по отношению к органическим соединениям БАС с различной молекулярной массой (K),
(подробнее см. в разделе "Анализ состава и свойств заявляемого БАС и препарата на его основе")

Продолжение таблицы 1

Иммуномодулирующие и регенеративные эффекты биологически активных средств (БАС)		Количественный показатель эффектов БАС в примерах				
		N 16	N 17	N 18	N 20	N 21
6. Усиление репаративных способностей гепатоцитов крыс по восстановлению активности после введения СС1, %, по сравнению с контролем	Na, K-АТФ-азы	87,1	78,4	94,0	91,4	100,0
	аминотрансфераз крови	97,1	93,0	100,0	96,2	100,0
	концентрации K ⁺ в гепатоцитах	67,2	58,0	75,4	75,1	93,5

Таблица 2

Органические соединения	Содержание органических соединений масс. % в БАС полученных по примерам						
	N 1	N 2	N 3	N 5	N 9	N 11	N 13
Полипептиды	37,7	34,7	40,9	20,6	21,9	25,1	13,7
Пептиды	18,0	18,5	19,1	20,1	23,9	25,0	20,3
И Т О Г О :	55,7	53,2	60,0	40,7	45,8	50,1	34,0
Аминокислоты	12,9	13,2	13,4	17,1	17,5	16,6	22,6
Углеводы в составе: -высокомолекулярных соединений с молекулярной массой M>10,0 кДа	5,0	4,0	1,0	2,2	0,8	0,4	1,4
-низкомолекулярных соединений с молекулярной массой M=0,8÷10,0 кДа	15,5	19,5	11,5	24,1	21,0	15,0	22,3
-свободных мономеров или соединений с молекулярной массой M<0,8 кДа	6,5	5,5	3,5	6,5	9,5	7,3	10,5
И Т О Г О :	27,0	29,0	16,0	32,8	31,3	22,7	34,2
Липиды, нуклеотиды и др органические соединения	4,4	4,6	10,6	9,4	5,4	10,6	9,2
В С Е Г О :	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000
Соотношение содержания углеводов и пептидов, G	0,86	1,05	0,60	1,20	0,88	0,60	1,10
Расчетный коэффициент эффективности, K	0,61	0,76	0,47	1,06	0,98	0,72	1,15

Таблица 3

Температура нагрева (термообра- ботки), °C	Активация макрофагов перитонеального экссудата крыс (in vitro) в результате воздействия заявляемого БАС, получен- ного при различной термообработке, %, по сравнению с контролем	
	Усиление фермента- тивной активности (НСТ-тест)	Усиление фагоцитар- ной активности по E. Coli
55	76,8 ± 4,6	53,8 ± 5,1
60	82,5 ± 4,9	70,8 ± 6,5
95	102,3 ± 5,5	92,1 ± 7,4
120	88,4 ± 5,1	78,3 ± 7,0
135	68,4 ± 5,0	66,2 ± 6,1

Различия с контролем достоверны при $P < 0,05$

Таблица 4

Порядковый номер фракции	Молекулярный вес фракций, M, кДа	Активация макрофагов перито- неального экссудата крыс, при воздействии низкомолекулярных фракций заявляемого БАС, %, по сравнению с контролем
1	$M_1 > 50,0$	58,4 ± 4,5
2	$10,0 < M_2 < 50,0$	103,6 ± 9,2
3	$M_3 < 10,0$	170,3 ± 18,1
4	$M_4 < 5,0$	186,8 ± 14,2
5	$M_5 < 1,0$	138,7 ± 12,3
6	$M_6 < 0,8$	86,2 ± 7,7
7	$M_7 < 0,5$	55,1 ± 6,4

Различия с контролем достоверны при $P < 0,05$

Таблица 5

Разновидности используемых животных тканей	Активация макрофагов перитонеального экссудата крыс (in vitro) в результате воздействия заявляемого БАС - TS, полученного из различных тканей, %, по сравнению с контролем	
	Усиление ферментативной активности (НСТ-тест)	Усиление фагоцитарной активности по E. Coli
Гепатоциты интактной печени	55,3 ± 4,7	43,9 ± 4,1
Интактная мышечная ткань взрослых животных	62,6 ± 4,8	55,7 ± 4,3
Сперматогонии и сперматозоиды семенников	81,3 ± 5,6	70,2 ± 4,8
Эпителиальная ткань кишечника	84,5 ± 5,9	73,2 ± 5,4
Гепатоциты печени после введения CCl_4	88,4 ± 5,4	78,8 ± 5,1
Клетки костного мозга	90,3 ± 6,8	81,6 ± 6,1
Ткань регенерирующих конечностей аксолотля*	92,4 101,2	83,6 94,1
Эмбриональная мышечная ткань	95,6 ± 6,2	88,2 ± 5,7
Гепатоциты регенерирующей печени крыс после гепатэктомии	112,4 ± 6,8	104,6 ± 6,2

Различия с контролем достоверны при $P < 0,05$

* - Ткань, для которой приведенные в таблице значения показателей получены при конкретном исполнении эксперимента

Таблица 6

Иммуномодулирующие и регенераторные эффекты биологически активных средств (БАС)		Количественный показатель эффектов БАС						
		Известные		Заявляемое БАС				
		N 1	N 2	WS	PM	TS	LM	CW
1. Повышение активности макрофагов перитонеального экссудата крыс, % по сравнению с контролем	ферментативной активности (НСТ-тест)	46,8 ±4,3		70,2 ±8,9	93,6 ±8,3	102,3 ±15,5	172,8 ±28,7	212,4 ±12,3
	фагоцитарной активности по E. Coli	33,4 ±4,3		61,4 ±12,1	81,7 ±9,2	92,1 ±14,4	153,6 ±31,8	186,3 ±14,6
2. Повышение активности нейтрофилов крови, % по сравнению с контролем	ферментативной активности (НСТ-тест)	67,2 ±3,8		84,3 ±9,4	105,2 ±10,7	116,7 ±14,6	148,7 ±19,7	171,3 ±10,3
	фагоцитарной активности по E. Coli	44,2 ±5,7		61,1 ±9,0	72,3 ±6,1	76,7 ±9,2	103,2 ±17,4	121,4 ±7,8
3. Стимуляция реакции бластотрансформации по сравнению с контролем, %	Т-лимфоцитов	42,3 ±4,6		58,6 ±6,2	75,4 ±8,1	83,2 ±17,4	131,7 ±20,3	176,1 ±15,8
	В-лимфоцитов	46,3 ±4,7		77,6 ±8,1	101,4 ±17,4	118,8 ±18,4	192,4 ±28,5	243,6 ±18,9
4. Увеличение титра тимического сывороточного фактора (ТСФ), %, по сравнению с контролем		117,8 ±9,1		310,6 ±76,7	412,7 ±84,5	496,4 ±70,1	764,3 ±94,6	948,7 ±58,9
5. Стимуляция естественной киллерной активности спленоцитов крыс, %, в сравнении с контролем		53,8 ±5,4	62,0 ±30,0	71,8 ±9,7	88,3 ±10,6	101,4 ±12,2	143,6 ±26,4	197,1 ±15,1
6. Усиление репарационных способностей гепатоцитов крыс по восстановлению активности после введения СС1, %, по сравнению с контролем	Na, K-АТФазы	22,6 ±3,4		35,4 ±5,1	51,2 ±6,2	56,3 ±7,1	86,2 ±7,8	95,7 ±4,3
	аминотрансфераз крови	23,4 ±4,8		71,6 ±10,3	85,3 ±7,1	91,4 ±4,6	96,5 ±3,5	98,1 ±1,9
	концентрации K ⁺ в гепатоцитах	14,2 ±3,1		25,4 ±4,7	36,8 ±5,8	41,2 ±5,4	66,7 ±8,7	84,3 ±9,2

Различия с контролем достоверны при $P < 0,05$

Таблица 7

Органические соединения	Содержание органических соединений, масс. % в БАС						
	Известных		Заявляемом				
	N 1	N 2	WS	PM	TS	LM	CW
Полипептиды	32,1 ±6,1	43,5 ±6,5	36,5 ±8,0	33,0 ±7,5	20,5 ±6,8	менее 0,3	
Пептиды	16,3 ±3,2	-	18,0 ±3,5	18,5 ±3,3	23,4 ±3,1	30,5 ±2,8	32,3 ±3,7
Аминокислоты	31,7 ±6,2	-	15,0 ±2,0	15,0 ±2,1	19,6 ±3,0	24,0 ±7,5	менее 0,5
И Т О Г О :	80,1 ±5,1	43,5 ±6,5	69,5 ±6,0	66,5 ±5,1	63,5 ±6,8	54,8 ±7,5	33,1 ±3,7
Углеводы в составе:							
-высокомолекулярных соединений с молекулярной массой $M > 10,0$ кДа	1,9 ±0,8	56,5 ±6,5	3,0 ±2,0	1,5 ±0,8	0,9 ±0,5	менее 0,2	
-низкомолекулярных соединений с молекулярной массой $M = 0,8 + 10,0$ кДа	3,0 ±0,5	-	15,5 ±4,0	20,5 ±4,8	18,7 ±3,7	24,9 ±5,9	49,7 ±8,3
-свободных мономеров или соединений с молекулярной массой $M < 0,8$ кДа	10,0 ±2,7	-	4,5 ±1,0	4,0 ±2,5	8,9 ±1,6	7,3 ±1,2	14,0 ±2,1
И Т О Г О :	14,9 ±2,7	56,5 ±6,5	23,0 ±7,0	26,0 ±6,8	28,5 ±5,8	32,4 ±5,5	63,9 ±6,1
Липиды, нуклеотиды и др органические соединения	5,0 ±1,6	-	7,3 ±3,0	7,5 ±3,1	8,0 ±2,6	12,8 ±4,2	3,0 ±2,5
В С Е Г О :	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
Соотношение содержания углеводов и пептидов, G*	0,18	-	0,86	1,11	0,80	0,82	1,54
Расчетный коэффициент эффективности, K*	0,16	-	0,63	0,82	0,91	1,60	2,04

Различия с контролем достоверны при $P < 0,05$

* Значения рассчитаны по среднестатистическим значениям величины, приведенным в таблице

Таблица 8

Фармацевтический, терапевтический и общебиологический эффект (свойство) при использовании биологически активных средств			Количественная характеристика			
			Известное БАС	Заявляемое БАС		
				N 1	WS	ST
1. Воспалительные процессы	Маститы у коров, % выздоровления	Опыт	70±5	80±5	86±5	93±5
		Контроль	61±5	58±8	63±7	53±8
	Воспаление легких, % выздоровления	Опыт	69±6	85±5	92±6	95±5
		Контроль	55±7	51±8	61±6	48±6
2. Инфекционные заболевания	Парагрипп и ОРЗ, % выздоровления	Опыт	70±6	88±6	94±6	95±5
		Контроль	64±7	58±6	61±7	67±5
3. Увеличение дополнительных привесов телят %, по сравнению с контролем			24±7	54±8	70±12	145±31
4. Острая токсичность, ЛД ₅₀ , мл/кг (мг/кг) массы тела			более 25 (260)	более 25 (260)		

Различия с контролем достоверны при $P < 0,05$

Упорядник

Техред М.Моргентал

Коректор Н.Милюкова

Замовлення 532

Тираж

Підписне

Державне патентне відомство України,
254655, ГСП, Київ-53, Львівська пл., 8

Виробничо-видавничий комбінат "Патент", м. Ужгород, вул.Гагаріна, 101

