

Изобретение относится к области биологии, ветеринарии и медицины, в частности к препаратам тканевых биологически активных веществ, содержащих комплекс водорастворимых полипептидов, и может быть использовано в биотехнологии получения биологически активных веществ из навозных червей высокой степени очистки.

Широко известно, что полипептидные препараты имеют биорегуляторные функции, например, факторы роста, цитомины, некоторые гормоны, они не видоспецифичны и имеют низкий уровень аллергогенности.

Распространены полипептидные экстрактивные препараты, разной степени гомогенности, полученные из различных сырьевых источников, которые используются в терапии многих патологических состояний: церебролизин (экстракт мозга телят), солкосерил (депротеинизированный экстракт крови телят), тималин (экстракт тимуса), сирепар (экстракт печени), спленин (экстракт селезенки) и ряд других препаратов (Мурашко В.В., Чечемова П.М. Солкосерил в лечении язвенной болезни. - Советская медицина. - 1979, № 2. - с. 97-99; Козлов В.А., Цимбалюк А.В., Некачалов В.В. Влияние тималина на процессы регенерации при переломах нижней челюсти. - Стоматология. -1979. - № 5, - с. 1-4; Спесивцев О.Г., Гольчанская Л.Д. Применение спленина в комплексном лечении больных туберкулезом легких. - Проблемы туберкулеза. -1985. - № 6.-с. 28-31).

Активность этих препаратов дала основание для поиска веществ полипептидной природы из других сырьевых источников. В частности известен препарат "солкосерил", содержащий комплекс водорастворимых полипептидов и аминок-, кето- и оксикислот, дезоксирибонуклеотиды и пурины. Препарат получен путем экстракции крови крупного рогатого скота. Препарат стимулирует ретикулоэндотелиальную систему, улучшает усвоение кислорода тканями, ускоряет репаративные процессы в тканях [1].

Однако, солкосерил не оказывает прямого ярко выраженного нормализующего действия на процессы перекисного окисления липидов и гемокоагуляции, т.к. не содержит достаточной доли чистых полипептидов. Soltysiak-Pawluczuk D., Jedrych A., Jastrzebski Z., Czyzewska-Szafran H., Danysz A., Modulation of anticancer drug toxicity by solcoseryl, Arch-Immunol-Ther-Exp-Warsz. 1991; 39(3), 253-259; Kryst L. Kowalik S., Bartkowski S., Henning G. Solcoseryl-dentys-tyczna pasta przylegajaca w leczeniu ostrego popromiennego zapalenia blony sluzowej Jamy ustnej, dziasel i jezyka. Wieloosrodkowe badania porownawcze SDAP i llnomagu. Czas-Stomatol. 1990, Jul; 43(7); 412-418; Malov I.S. Vliianie nekotorykh provoiiazvennykh preparatov na gumoral'nyi immunitet. Kln-Med-Mosk, 1991 Oct; 69(10); 71-74; Satoh H., Mori Y. Experimental study of protective effect of solcoseryl on cisplatin nephrotoxicity. Gan-To-Kagaku-Ryoho. 1992 Jan; 19(1); 89-93).

Известен также фибринолитический фермент - люмброкиназа, содержащий три основные фракции, которые представлены химорисинподобным, трипсинподобным ферментами и ферментом с уникальными свойствами. Препарат получен путем солевой экстракции исходного сырья, в качестве которого используют кольчатых червей *Lumbricus rubellus* [2]. Фибринолитическая активность фермента больше 100 единиц плазминогена или 250 урокиназных единиц на грамм. Молекулярный вес больше 20 кДа и изоэлектрическая точка 3,4.

Известен также протеиназоингибирующий фермент, полученный путем солевой экстракции из целомической жидкости кольчатых червей *Lumbricoideus terrestris*, содержащий два белка с молекулярной массой 20 и 42 кДа [3].

Недостатком известных препаратов на основе кольчатых червей является то, что они не обладают выраженным регенераторным действием.

В то же время недостатком способа получения препаратов путем солевой экстракции является недостаточная способность вытеснять связанные высокогидрофильные и сильно заряженные соединения, что может быть решено посредством использования кислотной экстракции [4].

Наиболее близким к описываемому способу получения заявляемого препарата является способ получения экстракта из тимуса, включающий уксусно-кислую экстракцию исходного сырья, в качестве которого используют тимусы крупного рогатого скота. Экстракцию сырья ведут 3% уксусной кислотой в течение трех суток с последующим отделением надосадочной жидкости при центрифугировании при 3000 об/мин. К надосадочной жидкости добавляют ацетон в соотношении 1:8. После формирования осадка жидкость удаляют, а осадок промывают ацетоном и эфиром, высушивают на воронке Бюхнера с получением целевого продукта, содержащего биологически активные вещества. Полученный этим способом препарат ускоряет развитие грануляционной ткани и эпителизацию ожоговых ран, но не оказывает влияния на характер построения новообразующейся соединительной ткани, ориентацию коллагеновых волокон, поскольку не обеспечивает получения требуемого спектра комплекса полипептидов [5].

В основу изобретения поставлена задача получения препарата тканевых биологических активных веществ, обладающих регенераторным действием с использованием для его получения кольчатых червей *Eisenia foetida*, что снижает себестоимость препарата и расширяет сырьевую базу за счет доступности исходного сырья.

Поставленная задача решается тем, что в состав комплекса водорастворимых полипептидов препарата тканевых биологически активных веществ входят полипептиды с молекулярной массой 4—12 кДа с максимумом спектра поглощения в УФ области 200-220 нм.

Полипептидный препарат получают путем уксуснокислой экстракции исходного сырья, в качестве которого используют кольчатых червей *Eisenia foetida*, *Lumbricoideus terrestris* и др. представителей кольчатых червей. Биологическую массу червей, выдержанную в течение суток в физиологическом растворе 0,9% NaCl, измельчают до размера 2х2х2 мм. После этого полученную массу заливают холодным (+4°C) ацетоном (особо чистым), в соотношении 1:8. После 12 часов выдержки при 4°C ацетон сливают, массу высушивают. После этого смешивают в соотношении 1:10 с 3% раствором уксусной кислоты с 0,1% хлорида цинка и 0,1% хлорида магния, в течение 72 ч при постоянном перемешивании (4°C). Жидкую часть смеси после фильтрации через ткань и фильтры 0,2 мкм смешивают с ацетоном в соотношении 1:10, выдерживают 12 ч при температуре 4°C. Дисперсную часть отмывают ацетоном и эфиром в соотношении 1:10, высушивают. Полученное вещество растворяют в дистиллированной воде pH = 4,5 (1:10) и лиофилизируют.

Изучение физико-химических свойств препарата потребовало проведения биуретовой реакции, которая характерна для пептидного типа связей, снятия спектров поглощения водного раствора препарата, а также проведения жидкостной хроматографии. Результаты биуретовой пробы были позитивными. Спектр поглощения препарата имел характерный пик в УФ области (см. фиг.1). Хроматографию проводили на приборе "Милихром-4" с применением колонки 1 мм х 250 мм, заполненной сорбентом "Силасорб С-18", элюент: ацетонитрил:вода (1:1) в 0,1% ортофосфорной кислоте. Детекция проводилась при длине волны 210 нм. Хроматограмма препарата представлена на фиг.2.

Таким образом препарат представляет комплекс водорастворимых полипептидов с молекулярной массой 4-12 кДа, обладающих щелочными свойствами, с максимумом спектра поглощения в УФ области (200-220 нм), имеющих характерную хроматографи-ческую кривую с 8 основными фракциями: удельный вес - 10,4; 5,8; 2,9; 35,4; 6,6; 16,0; 12,7; 8,2%; время удерживания 8, 10, 17, 20, 22, 25, 27, 30 мин соответственно.

В исследованиях, проведенных авторами не выявлено токсичности препарата, но дальнейшее изучение продолжается.

Изучение биологической активности препарата базировалось на том факте, что олигопептиды способны к регенерации больших участков тела, и на предположении, что полученные из такого сырья уксуснокислой экстракцией пептидные факторы массой 4-12 кДа могут быть регуляторами регенерации. Увеличение молекулярной массы свыше 12 кДа приводит к появлению у полипептидных молекул свойств ферментов и иммуномодуляторов (см. Кетлинский С.А., Симбирцев А.С., Воробьев А.А. Эндогенные иммуномодуляторы. - СПб.: Гиппократ, 1992. - 256 с.) и ведет к снижению регенераторного действия. При снижении молекулярной массы ниже 4 кДа у молекул также теряются регенераторные свойства, так как эти вещества в основной своей массе представлены гормонами.

Эксперимент был проведен на 20 белых крысах линии "Wistar" обоих полов, средней массой 200 г. Животным был нанесен дозированный дефект кожи спины размером 416 кв. мм, круглой формы под эфирным наркозом. Исследованные животные были разделены на 2 группы:

1 гр. - спонтанное заживление (5 крыс),

2 гр. - животным внутримышечно вводили препарат на физиологическом растворе (0,1 мл) в дозе 0,1 мг сухого вещества на крысу. Препарат вводили через час после нанесения дефекта, а затем каждый день в течение 10 суток.

Смертности животных не наблюдалось. Визуально наблюдали некоторые особенности состояния раневой поверхности: у животных 1 группы корка на ране была более темная и грубая, а у животных 2 группы струп по отношению к подлежащим тканям был более эластичным и подвижным.

Для объективности контроля процесса заживления раны проводили планиметрию дефекта: полиэтиленовая пленка прикладывалась к дефекту, его границы обрисовывались, затем контуры переносились на бумагу, соответствующий участок ее вырезался и взвешивался. Вес сравнивали с эталоном площади и результат выражали в квадратных миллиметрах. Эти измерения проводили 5 раз в течение 15 дней.

Гистологические наблюдения кожи проводили при объективе 10-кратного увеличения и дальнейшем микрофотографировании. Ткани фиксировались в 10% растворе нейтрального формалина, заливались в парафин и окрашивались гематоксилин-эозином.

Для изучения влияния препарата на состояние некоторых защитных систем были проведены исследования *in vitro* с кровью интактных морских свинок. У животных отбирали до 20 мл крови, которую стабилизировали 3,8% раствором цитрата натрия. Кровь, не смешивая, разделяли на 6 проб по 10 мл в каждой. В дальнейшем каждая проба была вновь разделена на две части по 5 мл.

Из которых одна должна была быть контрольной, а другая опытной. В контрольные пробы (К) вносили по 0,1 мл 0,15 М раствора NaCl, а в опытные (О) - по 0,1 мл такого же раствора, который имел 0,1 мг сухого препарата (из расчета 0,02 мг препарата на 1 мл крови). Кровь с указанными добавками инкубировали в течение 30 мин при 37°C. В плазме крови определяли время рекальцификации, каолиновое, тромбиновое, протромбиновое время, активированное частичное тромбиновое время (АЧТВ), концентрацию ТБК-активных продуктов в эритроцитах до и после инкубации в проокислительном буферном растворе (при этом образуется малоновый ди-альдегид - МДА-показатель уровня перекисидации), спонтанный гемолиз эритроцитов (ПРЭ), активность супероксиддисмутазы (СОД), соответственно принятым методикам. Статистическая обработка результатов проводилась по программе для вычисления критерия Стьюдента для выборок с попарно связанными вариантами (Статистическая обработка результатов научных исследований при помощи микрокалькуляторов "Электроника - БЗ-34, МК-52, МК-54". Методические рекомендации. М., 1987).

Оценка эффективности влияния препарата проводилась на основе результатов, полученных в ходе исследований, которые представлены в рисунках и таблицах 1-3.

В исследованиях *in vivo* получены следующие результаты. Заживление раны на первых этапах было ускорено у животных опытной группы, как следует из планиметрических данных (табл.1).

Как следует из данных, приведенных в табл.1, введение препарата ускорило процесс заживления раневого дефекта, при этом скорость закрытия дефекта была максимальной в первые 6 дней (фиг.3).

Для подтверждения лабораторных данных проводили гистологические наблюдения раневого участка кожи, которые представлены на микрофотографиях 1-4.

На микрофотографии 1 представлено заживление кожного дефекта у контрольных животных на 21 день после нанесения раны. Наблюдается прерывание эпидермального слоя кожи и наличие струпа, под которым врастает эпидермис. Базальная пластинка немного опухшая, расслоенная. В дерме хаотичные пучки волокон новообразованной соединительной ткани с расширенной васкуляризацией сосудами различного калибра.

На микрофотографии 2 у животных, которым вводили препарат, отмечается немного другая картина. Эпидермис интенсивно перемещается по струпу. Сам струп более нежный. Направление соединительнотканых пучков более систематизировано. В целом процесс заживления дефекта более интенсивный и адекватный.

На микрофотографии 3 представлено заживление кожного дефекта на 45 день после нанесения дефекта у контрольных животных. Эпидермис покрывает всю поверхность дефекта. На участке дефекта наблюдаются рыхлые хаотичные пучки соединительной ткани.

У животных опытной группы (микрофотография 4) не обнаружено подобных изменений. Пучки соединительной ткани ориентированы и более компактны. Таким образом, препарат имеет выраженный регенераторный эффект, особенно в ранние сроки заживления раны.

Как видно из приведенных в табл.2 данных, препарат в исследованиях *in vitro* вызывал умеренную гипокоагуляцию.

Анализ данных табл.3 показывает, что препарат снижал активность супероксид-дисмутазы, увеличивал спонтанный гемолиз эритроцитов и исходную концентрацию МДА в эритроцитах. После 1,5-часовой инкубации эритроцитов в прооксидантном буферном растворе под воздействием препарата повышалась концентрация МДА по сравнению с контрольными пробами. Возможно это отображает индуцированную препаратом оксидативную активность нейтрофилов, которая необходима для бактерицидной активности и очищения раневой поверхности от погибших клеток. Но, процент прироста МДА за время инкубации в опытной серии оказался существенно более низким, чем в контрольной, что указывает на мобилизацию антиоксидантной защиты под воздействием препарата.

В целом заявляемый препарат обуславливает эффективное регенераторное действие, прост и дешев в производстве, не требует дорогого сырья и оборудования.

Таблица 1

Динамика заживления раневого дефекта по данным планиметрии

Дни исследований		3	6	8	10	15 ,
Площадь раневого дефекта (кв.мм)	1 гр.	433,0 + 10,1	455,0 + 15,2	464,0 + 20,2	389,0 + 21,7	109,0 + 5,4
	2 гр.	422,7 + 9,2 $p > 0,05$	326,3 + 19,6 $p < 0,05$	307,3 + 24,2 $p < 0,05$	281,7 + 23,5 $p < 0,05$	86,5 + 8,2 $p < 0,05$
% площади леченной раны от нелеченной		97,4	71,7	66,2	72,4	79,4
% ускорения заживления раны		2,6	28,3	33,8	27,6	20,6

Таблица 2

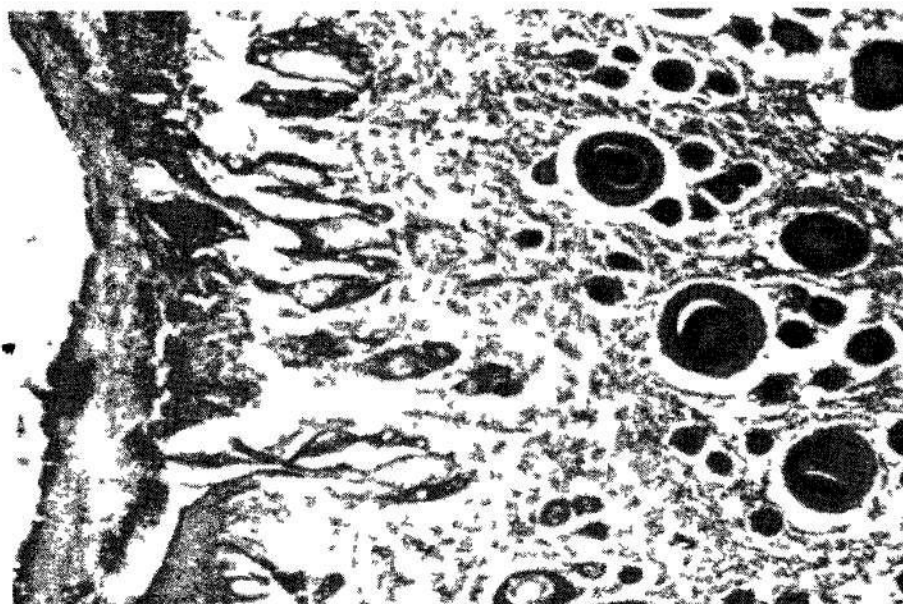
Влияние препарата на показатели коагулограммы в исследованиях in vitro

Время рекальцификации, С			Каолиновое время, с			Тромбиновое время, с			Протромбиновое время, с			АЧТВ, с		
К	І	О	К	І	О	К	І	О	К	І	О	К	І	О
95		100	60		71	30		20	41		46	50		55
65		81	55		57	29		30	37		45	42		47
97		127	64		72	27		27	44		48	47		59
67		75	50		63	22		24	47		51	40		57
92		95	70		65	21		27	73		180	90		101
155		80	130		220	35		33	43		42	145		90
$t = 2,52$ $p < 0,05$			$t = 5,0$ $p < 0,01$			$t = 1,2$ $p > 0,25$			$t = 5,0$ $p < 0,01$			$t = 4,39$ $p < 0,01$		

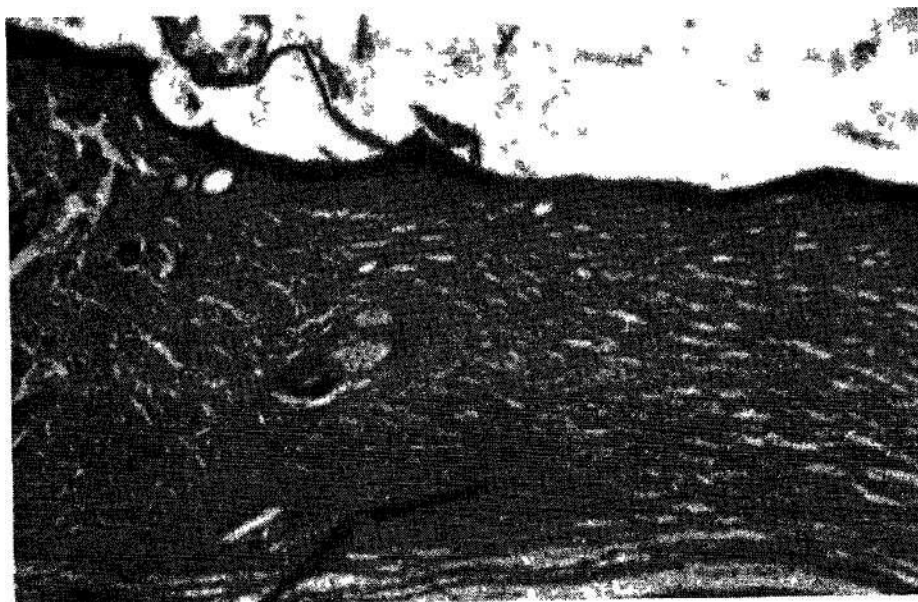
Таблица 3

Влияние препарата на показатели свободнорадикального окисления крови в опытах *In vitro*

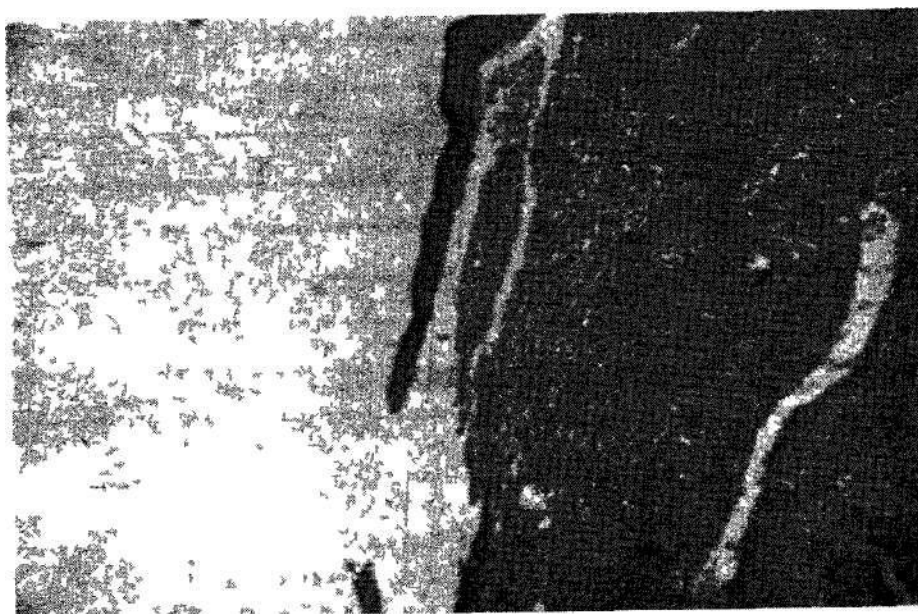
СОД. ЕД			ПРЭ. % гемолиза			Малоновый диальдегид, мкмоль/л								
						до инкубации			после инкубации			% прироста		
К	І	О	К	І	О	К	І	О	К	І	О	К	І	О
1,41		1,56	2,75		2,94	3,36		2,16	8,89		5,53	164,5		156,0
1,16		1,12	2,16		2,72	0,72		3,36	4,81		7,93	568,1		136,0
1,43		1,27	2,32		3,10	0,72		5,29	5,29		7,69	634,7		45,4
1,21		1,00	2,44		2,29	0,72		3,12	0,96		9,37	33,3		200,3
1,38		1,27	2,83		3,18	1,20		3,36	2,16		6,97	80,0		107,4
2,12		1,50	2,21		2,70	1,41		3,52	4,45		7,53	115,6		113,9
t = 2,1 p < 0,05			t = 1,7 p < 0,05			t = 1,8 p < 0,05			t = 1,2 p < 0,25			t = 1,9 p < 0,05		



Микрофотография 1 Заживление кожного дефекта у контрольных крыс на 21 день исследования



Микрофотография 2 Заживление кожного дефекта у опытных крыс на 21 день исследования



Микрофотография 3 Заживление кожного дефекта у контрольных крыс на 45 день исследования



Микрофотография 4. Заживление кожного дефекта у опытных крыс на 45 день исследования

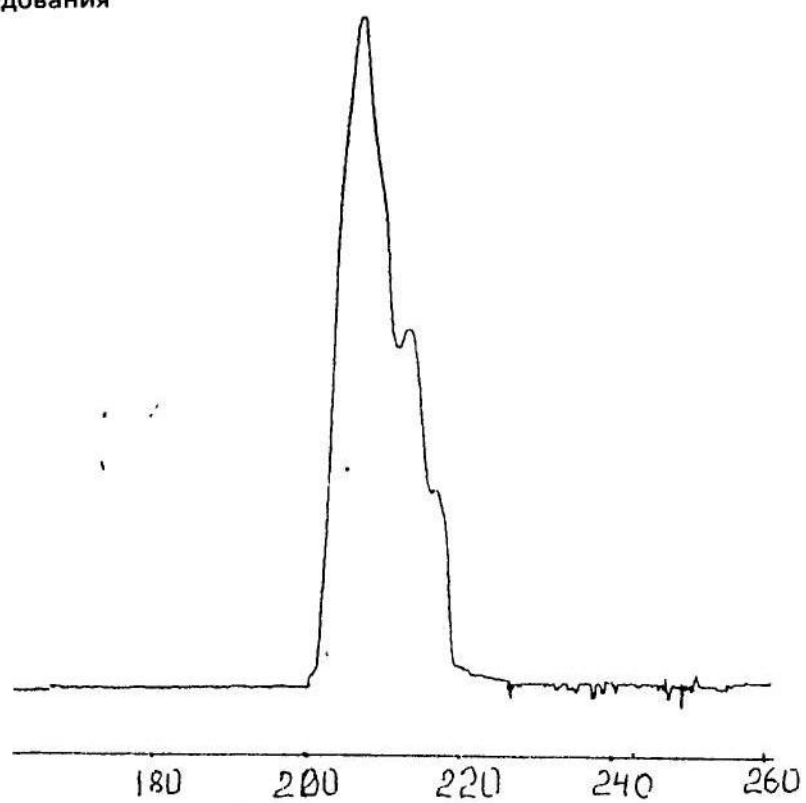
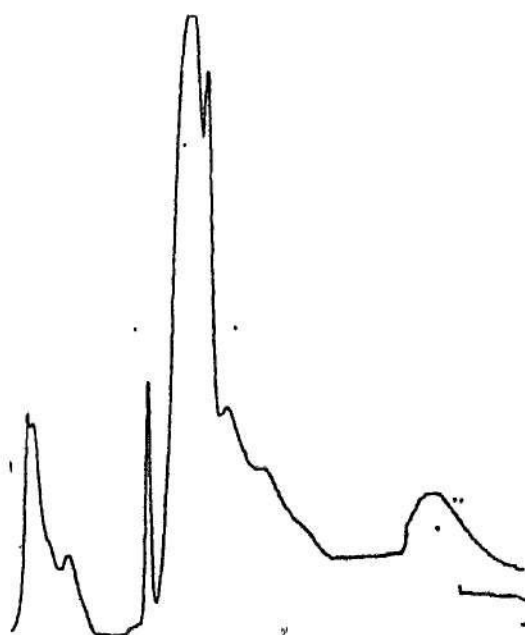
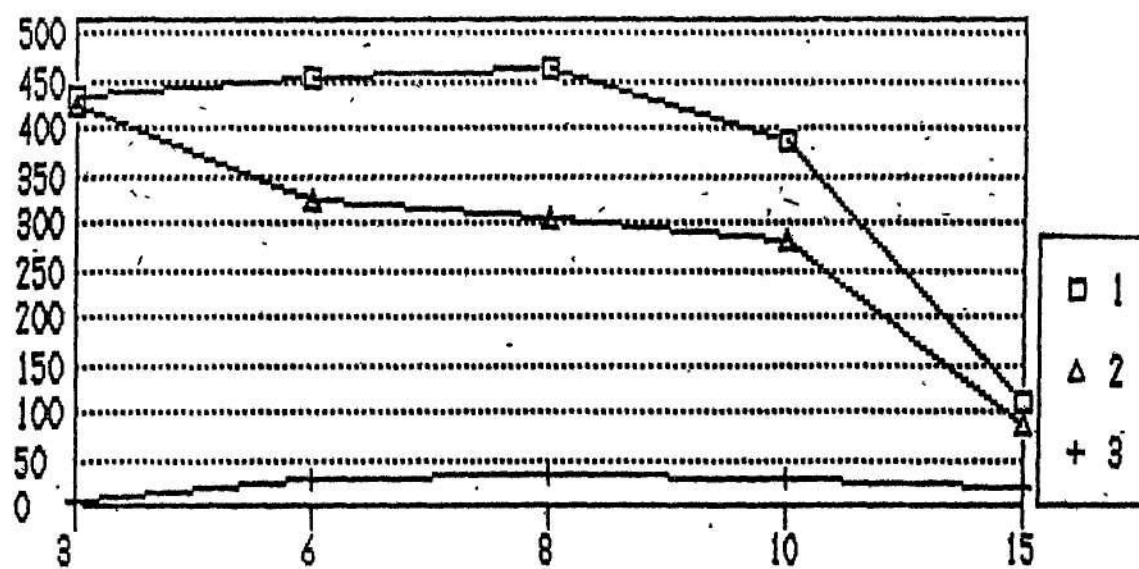


Fig. 1. Спектр поглощения препарата



Фиг. 2. Хроматограмма препарата



- 1 - контрольные животные
- 2 - опытные животные
- 3 - скорость заживления раны

Фиг. 3. Динамика заживления раневого дефекта по данным планиметрии