

ГБОУ ВПО Пермская государственная фармацевтическая академия
Министерства здравоохранения Российской Федерации

На правах рукописи

МАЛЬГИНА ДАРЬЯ ЮРЬЕВНА
**РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИИ ГЕМОДЕРИВАТА
ИЗ ОТХОДА ПРОИЗВОДСТВА ИНТЕРФЕРОНА
И ПЕРСПЕКТИВЫ ЕГО ИСПОЛЬЗОВАНИЯ**

14.04.01- Технология получения лекарств

Диссертация
на соискание ученой степени
кандидата фармацевтических наук

Научный руководитель:
доктор медицинских наук, профессор
Александр Викторович Казьянин

Научный консультант:
доктор медицинских наук
Лариса Владимировна Волкова

Пермь, 2014

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	4
ВВЕДЕНИЕ.....	5
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	11
1.1. Биотехнологические аспекты переработки белковых отходов.....	11
1.2. Перспективы использования производных крови человека.....	22
1.3. Аспекты переработки эритромаcсы крови доноров	26
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	33
2.1. Объекты исследований	33
2.2. Материалы исследований.....	33
2.3. Методы исследований	34
2.3.1. Физико-химические методы	34
2.3.2. Биологические методы	37
2.3.3. Вирусологический контроль.....	48
2.4. Статистический анализ результатов	49
ГЛАВА 3. Разработка технологии гемодеривата.....	50
и оценка его физико-химических свойств.....	50
3.1. Поиск оптимальных методов ферментативного гидролиза эритромаcсы крови человека.....	51
3.2. Характеристика физико-химических свойств гемодеривата.....	71
ГЛАВА 4. Изучение биологической активности гемодеривата.....	82
4.1. Оценка токсичности гемодеривата.....	82
4.2. Экспериментальное изучение антибактериальной активности гемодеривата.....	83
4.2.1. Оценка противомикробного действия гемодеривата на бактерии люминесцентного штамма <i>E.coli Lum</i> +	85
4.2.2. Изучение антибактериальной активности гемодеривата на штаммы условно-патогенных микроорганизмов	90
4.3. Изучение местно-раздражающего действия гемодеривата при кожных аппликациях <i>in vivo</i>	92

4.4. Оптимизация контроля качества человеческого лейкоцитарного интерферона с использованием перевиваемой клеточной линии SPEV, выращенной на питательной среде с гемодериватом.....	95
ВЫВОДЫ	117
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	120
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	131
СПИСОК ИЛЛЮСТРАЦИЙ.....	147
ПРИЛОЖЕНИЯ.....	150

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- АБПК – антибактериальный пептидный комплекс;
ВНК-21 – клетки почки новорожденного сирийского хомячка;
ГБ-Г – ферментативный гидролизат белков гороха;
ГБ-С – ферментативный гидролизат белков сои;
ГЛА – гидролиза лактальбумина;
ГСБМ – ферментативный гидролизат белков сыворотки молока;
ЖКТ – желудочно-кишечный тракт;
ИП – индекс пролиферации;
ИПБ – индекс подавления биолюминесценции;
ИФН – интерферон;
кДа – килодальтон;
КРС - крупный рогатый скот;
ЛЭК – легкое эмбриона коровы;
Мг – молекулярная масса;
МЕ – международная единица.
МТ-4 – линия Т-клеточной лейкемии;
ПГК – панкреатический гидролизат казеина;
ПС – питательная среда;
ПТ-80 – перевиваемая линия почки теленка;
СБК – сухой белковый концентрат;
ФГМ-С – гидролизат мышечных белков ферментативный сухой;
ФГОМП – ферментативный гидролизат белков мышечной ткани плодов коров и свиней, отходов мясоперерабатывающей промышленности;
ФЛЭЧ – фибробласты легкого эмбриона человека;
ФЭК – фибробласты куриных эмбрионов;
ЧЛИ – человеческий лейкоцитарный интерферон;
СНО-К1 – клетки яичника китайского хомячка;
L-929 – культура клеток мышечных фибробластов;
MEF – первичная культура клеток мышечных фибробластов;
Namalva – линия лимфобластоидных клеток;
SPEV – перевиваемая культура клеток почки эмбриона свиньи;
Vero – линия клеток почки африканской зеленой мартышки.

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность проблемы. Создание и освоение новых технологий является важной задачей современных биотехнологических предприятий. Основной причиной совершенствования или смены существующих технологий выступает стремление грамотно и экономически целесообразно использовать дорогостоящее сырье. Например, это касается производства препаратов крови человека. Высокая ценность белков человеческой крови придает особое значение необходимости полного и рационального использования всех имеющихся сырьевых геморесурсов, в том числе и отходов.

При производстве человеческого лейкоцитарного интерферона в результате фракционирования лейкоэритроцитомассы образуется белковый отход в виде эритроцитомассы. До настоящего времени одним из способов переработки данного продукта явилась технология неспецифического ферментативного расщепления исходного субстрата с получением питательной среды для культивирования бактериофагов [15], что является недостаточным для грамотной утилизации всего образующегося объема эритроцитомассы. Филиалы научно-производственного объединения «Микроген», перерабатывающие кровь человека, сосредоточены в таких городах России, как Пермь, Уфа, Томск и др. [26]. Подобный продукт образуется также на станциях переливания крови, количество которых в стране по данным на 2013 год, составляет 79, и это число постоянно растет [85]. Таким образом, поиск методов переработки эритроцитомассы с целью получения функциональных продуктов на ее основе не только приведет к оптимизации и повышению рентабельности производств, в которых используется кровь человека, но и к минимизации технологических потерь со снижением неблагоприятного влияния не утилизируемых белковых отходов на экологическое равновесие в природе.

Одним из перспективных методов выделения биологически активных компонентов из эритроцитомассы донорской крови является гидролиз – один

из распространенных методов переработки белковых веществ для производства ценных продуктов. На основе белковых гидролизатов получают препараты, которые широко применяют на практике. Например, в медицине – как кровезаменители для парентерального питания; в ветеринарии – для повышения резистентности животных к заболеваниям; в биотехнологии – как источник аминокислот и пептидов для бактериальных и культуральных питательных сред; в пищевой промышленности – в качестве улучшителей вкусовых и энергетических характеристик продуктов питания; в косметологии – как основные составляющие косметических препаратов [3, 28, 74]. Понятно, что качество и свойства белковых гидролизатов, предназначенных для различных областей применения, обусловлены составом исходного сырья, способом гидролиза и последующей обработкой полученного продукта.

Варьирование способов производства белковых гидролизатов позволяет получать продукты с заданными свойствами. В зависимости от содержания аминокислот и наличия полипептидов соответствующей молекулярной массы может быть выявлена область наиболее эффективного использования гидролизатов. Так, в медицине целесообразно использовать гидролизаты, содержащие до 20% свободных аминокислот. В ветеринарной практике для повышения естественного иммунитета животных преимущественным требованием является высокое содержание в препаратах пептидов (до 80%) [43]. Но основным условием при использовании белковых гидролизатов в различных областях биотехнологии является сбалансированный и полноценный аминокислотный состав. В этом случае подбор гидролизующего агента играет первостепенную роль.

Цель исследования – создание унифицированной технологии депротеинизированного гемодеривата эритроцитной массы крови человека (далее – гемодеривата) с оценкой возможности его применения в производстве медицинских иммунобиологических препаратов.

Основные задачи исследования:

1. Разработать технологию ферментативного гидролиза эритромы крови человека для получения гемодеривата.
2. Оценить физико-химические свойства гемодеривата.
3. Разработать оптимальный состав полусинтетической питательной среды с добавлением гемодеривата для культивирования перевиваемой клеточной линии почки эмбриона свиньи (SPEV).
4. Оценить эффективность использования клеточной линии SPEV, полученной на питательной среде, содержащей гемодериват, при определении противовирусной активности полуфабриката человеческого лейкоцитарного интерферона.
5. Изучить спектр биологической активности гемодеривата.

Личный вклад автора. Все приведенные в диссертации данные были получены лично автором на базе ГБОУ ВПО «Пермская государственная фармацевтическая академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации и в филиале ФГУП «НПО «Микроген» Министерства здравоохранения Российской Федерации «Пермское НПО «Биомед».

Научная новизна. Разработана оригинальная технология ферментативного гидролиза эритромы, позволяющая получать низкомолекулярную фракцию пептидов, обладающую высокой биологической активностью благодаря полноценному аминокислотному составу исходного сырья, безопасную в вирусологическом отношении. Особенность технологии заключалась в разработке способа подготовки сырья, осветления и депротеинизации для изготовления готового продукта. В результате получали препарат низкомолекулярных пептидов, нетоксичный для клеточной линии SPEV. Показано, что раствор гемодеривата обладает антибактериальной активностью в отношении штаммов условно-патогенной аэробной микрофлоры. Также выявлено свойство раствора гемодеривата, выраженное в стимуляции роста ворса при накожных аппликациях морским свинкам.

Впервые разработан вариант приготовления ростовой питательной среды, содержащей гемодериват. Проведена оценка пролиферативной активности питательной среды, содержащей гемодериват, с использованием клеточной линии SPEV. Доказано, что клеточная линия SPEV, полученная на питательной среде с гемодериватом, может быть применена в технологическом процессе производства человеческого лейкоцитарного интерферона при оценке его противовирусной активности.

Теоретическое и практическое значение работы. Теоретическая значимость результатов исследований состоит в расширении знаний о биологических свойствах производных крови человека. Показана возможность получения гемодеривата из побочного продукта технологии человеческого лейкоцитарного интерферона – эритроцитной массы донорской крови. Доказана большая эффективность гемодеривата в качестве компонента питательной среды для выращивания клеточной линии SPEV по сравнению со стандартной средой. Выявлено свойство гемодеривата, выраженное в стимулировании роста ворса на экспериментальной модели – морской свинке. Полученные результаты явились обоснованием дальнейшего изучения и возможности использования побочного продукта технологии человеческого лейкоцитарного интерферона – эритроцитной массы донорской крови.

В ходе выполнения данных исследований разработаны:

- технология депротеинизированного гемодеривата из побочного продукта технологии человеческого лейкоцитарного интерферона – эритроцитной массы крови человека;
- состав питательной среды, содержащей гемодериват, для культивирования клеточной линии SPEV, используемой, в свою очередь, при оценке противовирусной активности человеческого лейкоцитарного интерферона. На базе Пермского филиала НПО «Микроген», цеха препаратов крови, отделения интерферона установлен эффект питательной среды, содержащей гемодериват, превосходящий по индексу пролиферации и времени таковой на стандартной среде 199. Питательная среда, содержащая гемодериват,

является перспективной для использования в производстве человеческого лейкоцитарного интерферона с целью совершенствования процесса контроля качества препарата, а также стремления к малоотходному или безотходному биотехнологическому производству.

Апробация работы. Основные положения и результаты диссертационной работы доложены на XVIII Российском национальном конгрессе «Человек и лекарство» (Москва, 2011); XLIX международной научной студенческой конференции, секция «Биология» (Новосибирск, 2011); научно-практической конференции «Актуальные проблемы науки медицинских и фармацевтических вузов: от разработки до коммерциализации» (Пермь, 2011); XIII региональной научно-практической конференции студентов и молодых ученых «Химия. Экология. Биотехнология- 2011» (Пермь, 2011); 50-ой юбилейной международной научной студенческой конференции «Студент и научно-технический прогресс» (Новосибирск, 2012); XIV региональной научно-практической конференции студентов и молодых ученых «Химия. Экология. Биотехнология-2012» (Пермь, 2012); инвестиционном форуме Startup Bazaar (Новосибирск, 2012); международной конференции молодых ученых «Биология – наука XXI века» (Пушино, май 2012); 17-ой международной Пушинской школе-конференции молодых ученых «Биология – наука XXI века» (Пушино, 2013); XV международном конгрессе МАКМАХ/ESCMID по антимикробной терапии (Москва, 2013).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 12 научных работ, включая 2 статьи в журналах, рекомендованных высшей аттестационной комиссией для публикации результатов научных исследований по кандидатским диссертациям. Получено решение о выдаче патента на изобретение, декабрь 2013, заявка №2012123195.

Объем и структура диссертации. Работа изложена на 146 страницах машинописного текста, содержит 25 таблиц, 18 рисунков, 3 приложения. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов,

двух глав экспериментальных исследований, заключения, выводов, списка цитируемой литературы, включающего 134 источника, из них 99 на русском и 35 на иностранном языке, списка иллюстраций.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Технология гемодеривата из эритроцитной массы донорской крови – побочного продукта технологии человеческого лейкоцитарного интерферона.

2. Результаты исследований физико-химических свойств гемодеривата, критерии контроля воспроизводимости технологии гемодеривата.

3. Состав питательной среды, содержащей гемодериват, для выращивания клеточной линии SPEV. Методы контроля и оценки биологической активности готовой питательной среды, содержащей гемодериват.

4. Эффективность использования питательной среды, содержащей гемодериват, для контроля качества человеческого лейкоцитарного интерферона.

5. Характеристика спектра биологических свойств гемодеривата и возможности его применения в технологии лекарственных препаратов.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности.

Научные положения диссертации соответствуют формуле специальности 14.04.01 – технология получения лекарств. Результаты проведенного исследования соответствуют области исследования специальности, конкретно пункту 7 паспорта 14.04.01 – технология получения лекарств.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Одним из факторов, оказывающих благоприятный эффект на внешнюю среду, является разработка и освоение безотходных технологий в различных отраслях промышленности, основными видами ценных в биологическом смысле отходов которых являются белковые вещества. Исследования процесса деградации белковых веществ показали, что многие отходы пищевой, медицинской и фармацевтической промышленности являются ценным резервным источником белка, которые после соответствующей биохимической трансформации могут быть превращены в аминокислотно-пептидные смеси, имеющие биологическую ценность [42, 88]. Использование деградированных белковых отходов не только расширяет сырьевую базу при получении обогащенных смесей для культивирования микроорганизмов, но и позволяет открыть ранее не выявленные свойства деструктурированных белков. Методы химико-ферментативной трансформации могут способствовать решению задачи о рациональном применении малоиспользуемых отходов, к которым можно отнести отходы производства препаратов крови.

1.1. Биотехнологические аспекты переработки белковых отходов

Сам по себе белок неактивен и без определенной обработки или расщепления до мономеров не способен проявлять активность в биологических системах [43, 132]. При поиске источников и методов получения биологически активных производных белка основополагающим явилось:

- доступность исходного сырья;
- простота способа и неагрессивные условия переработки;
- дополнительная прибыль предприятия.

Одним из биотехнологических способов деструкции белков, в результате которого происходит разрыв пептидных связей белковой молекулы, является гидролиз. В результате такого процесса получают продукты полного или частичного гидролиза в зависимости от используемого литического агента и

физико-химических условий воздействия. Проблема гидролиза белков и её практическая реализация с давних пор привлекают внимание исследователей. Значение белковых гидролизатов объясняется ещё и тем, что расщепление субстрата аналогично процессу пищеварения с той разницей, что в искусственно созданных условиях можно подбирать и комбинировать литические агенты (кислоты, щелочи, ферменты). Белковые гидролизаты преимущественно содержат: аминокислоты – вещества, необходимые для синтеза белков; пептиды – стимуляторы роста, модуляторы иммунной и нервной системы; микро- и макроэлементы. Вследствие этого объектами воздействия гидролизатов могут быть различные живые организмы и ткани (человек, животное, клетки) [25].

Полный гидролиз белка происходит только путем нагревания и выдерживания при температуре более 100 °С с добавлением концентрированных растворов минеральных кислот и щелочей. В результате химических превращений в гидролизованной смеси кроме преобладающих свободных аминокислот и пептидов обнаруживается множество побочных продуктов. Чаще всего белок расщепляют концентрированной серной или хлористоводородной кислотой. В процессе жесткого кислотного гидролиза происходит значительное искажение белковых структурных единиц. Полностью разрушается триптофан. Наряду с этим подвергаются разрушению и рацемизации (образование стереоизомеров аминокислот, которые не усваиваются организмом) оксикислоты, дикарбоновые кислоты и пролин. Имеются сообщения, что в низкомолекулярных пептидах, которые являются биологически активными соединениями, образуются концевые структурные деформации, что делает их неузнаваемыми рецепторами клеток [91]. В результате кислотного гидролиза происходит расщепление и других биологических полимеров: нуклеиновых кислот, полисахаридов. При разрушении аминокислот образуются альдегиды, аммиак и углекислый газ, а из сахара – гексозы (например, оксиметилфурфурол). Альдегиды и оксиметилфурфурол взаимодействуют с молекулами аминокислот, образуют

меланоиды, оказывающие токсическое действие на чувствительные клеточные системы. В результате кислотного гидролиза возникают D-изомеры некоторых заменимых аминокислот, которые не усваиваются клеткой и могут быть ингибиторами клеточного роста. Внесение концентрированных кислот для проведения гидролиза требует их нейтрализации по окончании процесса, что приводит к высокому содержанию хлоридов и сульфатов, токсичных для биологических объектов. Продукты кислотного расщепления имеют высокое содержание золы за счет соединений азота, чем в отрицательном смысле отличаются от ферментативных гидролизатов [91, 97].

Щелочной гидролиз белков применяют в непищевых отраслях промышленности. Сырьем может быть кровь, кожа, кости, рога, копыта, щетина, перья животных, рыба чешуя, жмых масличных культур, то есть промышленные отходы. При щелочном гидролизе происходит рацемизация большинства аминокислот и полное разрушение аргинина, лизина, цистина и цистеина. В результате действия щелочей образуется комплекс дефектных, чуждых для микро- и макроорганизмов компонентов. Процедура очистки щелочных гидролизатов – сложный и длительный процесс, в результате которого снижается так же концентрация легкоусвояемых веществ. Щелочные гидролизаты белков в дальнейшем не применяют в пищевой или фармацевтической промышленности. Одной из основных отраслей использования щелочных гидролизатов является производство пенообразователей [1, 97].

Гидролиз белков, осуществляемый с помощью протеолитических ферментов, лишен всех перечисленных недостатков кислотного и щелочного метода воздействия [43]. Говоря о ферментативном гидролизе как процессе промышленного получения биологически активных субстанций, подразумевают современное биотехнологическое производство [87]. Гидролизу ферментами – протеолизу – принадлежит важная роль в процессах модификации пищевых белков и производстве белковых гидролизатов в пищевой промышленности. Получение биологически активных пептидов

методом протеолиза из неактивных белковых предшественников является перспективным методом выделения биопептидов [14]. В ходе такого процесса не происходит серьезных структурных изменений продуктов гидролиза, т.е. на выходе компоненты физиологичны, способны легко проникать в живые клетки и включаться в процессы клеточного метаболизма. При ферментативном гидролизе белоксодержащего сырья практически отсутствуют отрицательные моменты наиболее часто используемого кислотного способа гидролиза, связанные с распадом незаменимых и биологически значимых аминокислот, таких как триптофан и цистеин. Существующие недостатки – сравнительно медленное течение гидролиза, вероятность попадания в гидролизат продуктов расщепления самих протеолитических энзимов и загрязнения бактериями – не исключают высокой значимости ферментативного метода гидролиза, которая заключается в возможности сохранения аминокислотного состава исходного сырья. Например, в продуктах ферментативного гидролиза белков крови сельскохозяйственных животных при правильно подобранных условиях преобладают по содержанию низкомолекулярные пептиды. Биологическая активность таких пептидов выражается множеством функциональных свойств, включая антибактериальный, иммуномодулирующий, антиокислительный и противоопухолевый эффект [112, 134]. Стоит подчеркнуть, что набор свойств гидролизата зависит от природы происхождения исходного сырья и выбранного протеолитического агента [108]. При ферментативном протеолизе субстрата в промышленности используют принципы переваривания пищи в ЖКТ, например, процесс гидролитического расщепления белков с помощью ферментов животного происхождения. Причем, наиболее близки по свойствам к ферментам ЖКТ человека ферменты, выделяемые из организма свиней [113].

Таким образом, методы деструкции белка посредством гидролиза подбирают в зависимости от требуемого технического результата. Варьирование способов получения белковых гидролизатов позволяет производить продукты с заданными свойствами. В зависимости от содержания аминокислот и наличия полипептидов в диапазоне соответствующей

молекулярной массы может быть определена область наиболее эффективного применения гидролизатов. Но основным требованием при применении гидролизатов является сбалансированность по аминокислотному составу. Кислотный и щелочной способ гидролиза в экстремальных условиях (высокая температура, концентрированные литические агенты) подходит для достижения высокой степени расщепления белка и полной утилизации протеинового сырья (например, больших объемов отходов) за короткий промежуток времени (от 3-х до 24-х часов). Но при этом теряется исходный аминокислотный композит субстрата, т.е. гидролизаты становятся неполноценны. Ферментативный гидролиз интересен с точки зрения утилизации белков и белковых отходов животного происхождения в мягких условиях с целью получения смеси низкомолекулярных пептидов, имеющих свойство регуляции биологических функций высших организмов.

Как уже было сказано, кислотный гидролиз в большинстве случаев ведут до предельно полной степени расщепления белка, что обеспечивает возможность получения в конечном продукте смеси свободных аминокислот. Аминокислоты, в отличие от белков, не обладают ни видовой, ни тканевой специфичностью. Растворы гидролизованных белков животного происхождения при достаточной степени гидролиза и очистки, не должны вызывать обусловленных сенсibilизацией побочных эффектов. В то же время они вполне обеспечивают потребность организма в строительном материале, который используется в соответствии с индивидуальными требованиями. Очищенные и концентрированные композиции, полученные в результате кислотного гидролиза, являются одним из компонентов для проведения парентерального питания. На сегодняшний день к сбалансированным растворам аминокислот предъявляются определенные требования, в том числе высокое содержание незаменимых аминокислот, без которых невозможен полноценный белковый синтез [82]. В настоящее время из белков человеческой крови получают такие препараты для парентерального белкового питания, как аминокровин и инфузамин [47].

Изначально аминокровин получали из белков крови животных с последующей очисткой на анионитах и автоклавированием [59]. В настоящее время аминокровин получают путем неполного кислотного гидролиза белков крови человека с добавлением глюкозы [47]. Производителями аминокровина в России являются филиалы объединения Микроген (Екатеринбург, Нижний Новгород), а так же Тюменская областная станция переливания крови и др. Использование аминокровина не является широко распространенным ввиду наличия у препарата серьезных противопоказаний, а так же нехватки сырьевого ресурса – цельной крови человека. К тому же, аминокровин является потенциально опасным источником гемотрансмиссивных инфекций, поскольку в качестве субстрата для его изготовления чаще всего используется забракованная кровь доноров [10].

Другой препарат – инфузамин – продукт глубокого кислотного гидролиза белков крови человека с добавлением синтетических аминокислот: L-триптофана и L-изолейцина. Инфузамин так же, как аминокровин, используется для парентерального питания и отличается по составу в виду более полного гидролиза исходного сырья, отсутствием пептидов, что увеличивает усваиваемость и уменьшает опасность появления побочных явлений. Такой препарат используется чаще в медицинской практике по сравнению с аминокровином. Добавление в состав инфузamina синтетических аминокислот увеличивает наряду с эффективностью еще и стоимость препарата [47]. Таким образом, при использовании в качестве субстрата крови человека с полноценным аминокислотным составом и переработанного в дальнейшем методом кислотного гидролиза, состав конечного продукта теряет множество биологических функций за счет разрушения аминокислот. Соответственно, поиск путей преодоления данной проблемы является актуальным.

Для получения на основе белков ценных в биологическом смысле субстанций и сохранения исходного аминокислотного композита сырья необходимо создать определенные условия гидролиза. Более перспективными для получения биологически активных веществ на основе вышесказанного

можно считать ферментативный гидролиз. Хотя в результате ферментативного гидролиза довольно сложно получить смесь, состоящую только из аминокислот, преимуществами данного способа пренебрегать нельзя. Разрабатываемые препараты на основе белков являются ферментативными гидролизатами непищевого сырья и представляют собой сухие сыпучие порошки от желтого до коричневого цвета с характерным запахом [66]. Например, в состав препарата «Витапептид» входит около 15% аминокислот, более 70% полипептидов с преимущественным содержанием средне- и низкомолекулярных пептидных фракций и ряд биологически активных веществ. Такой препарат, действуя через многочисленные сложные реакции, регулирует рост клеток путем регуляции метаболизма и его активизации. Многие из этих веществ, в частности пептиды, являются биокоординаторами и проявляют активность в условиях физиологических нарушений. «Витапептид», а так же аналогичные препараты разрешены к применению в Российской Федерации, для них разработаны комплекты нормативной документации по производству, контролю и применению. Разработки защищены патентом [66]. Высокая эффективность гидролизных препаратов, подтвержденная результатами клинических и производственных исследований, а также относительная простота технологии их изготовления при минимальных затратах являются предпосылками для разработки и создания новых препаратов для лечебных и профилактических целей в медицинской, диагностической и фармацевтической практике.

Биологические свойства белковых гидролизатов определяют область их дальнейшего применения. Например, пептиды, образующиеся в процессе ферментативного гидролиза белков, обладают ростостимулирующей активностью [2, 78], что открывает возможность использования ферментативных гидролизатов в производстве бессывороточных и малосывороточных ПС [32]. Недостатком этого метода явилась невысокая степень гидролиза. Поэтому при гидролизе белков высокие требования предъявляются к ферментным препаратам [2,20]. Дальнейший прогресс в

производстве гидролизатов белков предполагал повышение качества и расширение номенклатуры ферментных препаратов с высокой протеолитической активностью.

Впервые среда на основе ферментативного гидролизата лактальбумина (ГЛА) была предложена в 1952 г. Мельником и Риорданом для культивирования клеток почки обезьян [117]. Питательная среда на основе ГЛА и солевого раствора Хэнкса или Эрла проста в изготовлении, характеризовалась высокими ростовыми свойствами, использовалась для получения широкого спектра клеточных культур и являлась одной из самых распространенных в вирусологической практике [11, 18]. Гидролизат лактальбумина получали ферментативным гидролизом белков молока, содержащим в своем составе 18 аминокислот, в том числе и те, которые необходимы для культивирования клеток [133]. На данный момент ГЛА изготавливается фирмой Дифко (США) и импортируется в Россию [105, 110].

Успех применения ГЛА послужил основанием для разработки отечественных гидролизатов из белоксодержащего сырья как животного, так и растительного происхождения. В настоящее время применяют ряд ферментативных гидролизатов: ГСБМ, ФГМ-С, ГБ-С и ГБ-Г. В состав таких гидролизатов входит 13-18 аминокислот, а так же пептиды – продукты неполного гидролиза белков [21, 89, 90].

Испытания ростообеспечивающей способности ПС на основе ГСБМ показало возможность ее широкого применения для культивирования без предварительной адаптации как первичных культур, так и диплоидных штаммов, например, легкого эмбрионов коровы, сердца теленка, сердца ягненка, щитовидной железы свиньи и постоянных клеточных линий SPEV [39, 73]. При этом было отмечено, что использование указанных сред позволило снизить содержание сыворотки в составе ростовой ПС при культивировании отдельных линий клеток, в т.ч. щитовидной железы свиньи.

Гидролизат ФГМ-С – продукт ферментативного гидролиза мышечной ткани крупного рогатого скота или свиней, в состав которого входит не менее

18 аминокислот, в том числе незаменимые, суммарное количество которых составляет 63-69%. Питательная среда на его основе применяется для получения целого ряда клеточных культур. Замена ГЛА на ФГМ-С позволила снизить стоимость как ПС, так и производимых на ее основе культуральных биопрепаратов [70]. Однако существенным недостатком способа получения ФГМ-С явилось использование в качестве белоксодержащего сырья мышечной ткани крупного рогатого скота – ценного пищевого продукта.

В настоящее время для производства белковых гидролизатов проводятся исследования по изысканию и использованию нетрадиционного сырья: бобовых, отходов мясной, рыбной [109], молочной промышленности (казеин, кормовые дрожжи, кровь и кровезаменители), а также отходов вакцинно-сывороточного производства [61, 101]. В частности, существует промышленное производство ферментативных гидролизатов белков гороха и сои с целью приготовления питательных сред на их основе, пригодных для выращивания первичных и перевиваемых клеток [130].

Рядом авторов предлагалось получение ПС на основе ферментативных гидролизатов белков мышечной ткани плодов коров и свиней (ФГОМП), являющихся отходами мясоперерабатывающей промышленности [62]. Указанные среды, обогащенные комплексом витаминов, глутамином, пролином, тирозином (по 0,025%) и 4-6% сыворотки КРС, не уступали по составу синтетической среде 199. Следует отметить, что дефицитность исходного сырья и необходимость введения дополнительных компонентов затрудняет изготовление таких гидролизатов в больших объемах.

Из непищевого сырья и отходов зверобойного промысла рядом исследователей получены ферментативные гидролизаты и ПС на их основе: из мышц ластоногих – ПС "Целат"; из спиля шкур ластоногих и/или шкур КРС – ПС "Эпидермат" [62]. Указанные среды содержат в своем составе 17 аминокислот и по количеству аминного азота не уступают ПС 199, обладают высокими ростостимулирующими свойствами и пригодны для получения ряда первичных, а также перевиваемых культур клеток животных и человека, в

частности, перевиваемой линии клеток почки человека RH-PA. По этим данным можно сделать вывод, что среды на основе гидролизатов могут быть альтернативой синтетической среде 199 при получении больших количеств клеточной биомассы [63].

На основе обезжиренной мозговой ткани КРС, являющейся отходом производства медицинского препарата "Липоцеребрин", была разработана технология получения ферментативного гидролизата и ПС на его основе "Церебрат". Питательная среда "Церебрат" по своим ростостимулирующим свойствам идентична среде 199 и пригодна для культивирования перевиваемых линий клеток почки человека RH-PA и SPEV, диплоидных штаммов M-19 (фибробластов человека) и ЛЭК. Авторами исследований в этой области отмечено, что строгое соблюдение условий гидролиза и регулярный контроль физико-химических параметров процесса позволяют получать стандартный препарат, имеющий разброс количественных показателей аминокислот на уровне 5-6% [60].

Неиспользуемое сырье, получаемое в результате различных технологий медицинских иммунобиологических препаратов, так же могут служить субстратом для гидролиза. Так, из отходов производства гетерогенного антирабического иммуноглобулина получают питательную среду для культивирования холерного вибриона [68]. Из отходов производства гриппозной вакцины был разработан способ получения сухих ферментативных и кислотных гидролизатов, близких по физико-химическим свойствам к ГЛА [72] и которые оказались пригодными для получения ПС и выращивания линий клеток ВНК-21 и Vero [71]. Такие ПС оказались пригодными для культивирования ФЭК и ФЛЭЧ. Из отходов производства иммуноглобулинов человека был получен ферментативный гидролизат белков крови. Питательная среда, приготовленная на его основе, обеспечивала рост культур клеток ФЭК, ФЛЭЧ, ВНК-21.

Промышленность выпускает для лечебных целей кровезаменители и средства для парентерального питания аминокислот и гидролизин,

являющиеся, соответственно, ферментативным и кислотным гидролизатами крови КРС. Указанные препараты характеризуются полным набором аминокислот, пептидов, обладают высокой стандартностью и изготавливаются в соответствии с требованиями фармакопейных статей. Аминопептид входит в состав ростовых сред и успешно используется для получения MEF, а также ПТ-80 и в производстве вакцинных препаратов [37].

В литературе имеются сведения о широком применении ПГК в качестве аминокептидной основы для получения ПС, используемых в вирусологической практике для культивирования клеточных линий и вирусов. Панкреатический гидролизат казеина содержит 10 из 14 необходимых для клеток аминокислот, а также пептиды, выполняющие роль сывороточных факторов, что делает возможным использование ПГК для культивирования клеток млекопитающих и в качестве перспективного заменителя сыворотки КРС. В этом случае в состав ПС вводят ПГК – 0,3 %, комплекс витаминов, недостающие аминокислоты (аргинин, глутамин, триптофан, цистин), концентрацию сыворотки КРС снижают до 2 %, а для достижения требуемой вязкости в состав ПС дополнительно вводится 0,2 % поливинилпирролидона. Использование ПС на основе ПГК позволяет снизить концентрацию сыворотки крови КРС или эмбриональной сыворотки в 5-10 раз и обеспечить интенсивную пролиферацию суспензионных клеток ВНК-21, Namalva и МТ-4. Заменитель сыворотки, состоящий из ПГК и высокомолекулярного пирролидона, успешно апробирован в практике в составе малосывороточных ПС и рекомендуется для культивирования перевиваемых линий СНО-К1, Vero, L-929, а также гибридом человека G10C3 и G10A1, выращиваемых обычно только на богатых по составу средах с эмбриональной сывороткой [32]. Среду, содержащую ПГК, так же использовали для культивирования коклюшного микроба, изучение которого востребовано ввиду различной вирулентности серотипов [65, 77, 95].

Использование белковых гидролизатов для замены или частичного снижения сыворотки в составе ростовых ПС в последние годы находит все большее применение [33, 78]. При разработке ПС для каждой отдельно взятой

линии клеток рекомендуется индивидуальный подбор оптимальных условий: степени очистки гидролизата, концентрации в ПС, необходимость обогащения ПС вспомогательными компонентами. Так, например, для линии клеток почки сайгака, хорошо размножающейся в статических и роллерных условиях в среде Игла с 5-10% сыворотки крови КРС, при смене среды на гидролизатные, содержащие ГЛА, ГБК-С и ФГМ-С, изменяется морфология культуры клеток и чувствительность к вирусам.

В поиске других путей использования гидролизатов естественным было воспользоваться сведениями, полученными в процессе становления клеточной биотехнологии, и, в частности, в области конструирования питательных сред на их основе. В отдельных случаях ценность гидролизатов сравнима с рядом сывороток млекопитающих. Составными элементами гидролизатов являются в основном вещества с молекулярной массой менее 10 кДа – биодоступные пептиды и аминокислоты, обладающие проникаемостью через кожный барьер. Их можно рассматривать как потенциальные активаторы метаболизма при применении наружно или парентерально, например, для регенерации кожных покровов, заживления ожогов, ран, стимуляции роста и питания фолликул волос. Таким образом, альтернативным вариантом использования белковых гидролизатов, обладающих питательной ценностью, является введение их в составы лечебных препаратов для наружного и парентерального применения.

1.2. Перспективы использования производных крови человека

Источниками сырья при получении биологически активных субстанций служит множество субстратов животного и растительного происхождения. Применение дешевого сырья снижает себестоимость готового продукта, а соответственно выгодно предприятию как при использовании в дальнейшем в собственных нуждах, так и для реализации на рынке. Предприятия, работающие на основе дорогостоящего и дефицитного белкового сырья, могут выйти на высокотехнологичный уровень при условии грамотной утилизации отходов. Примером является современное производство препаратов

крови, основным сырьевым компонентом которого является кровь доноров. Высокая ценность белков человеческой крови придает особое значение полному и рациональному использованию всех имеющихся сырьевых геморесурсов.

Одним из путей использования отхода производства иммуноглобулина человека – осадка Б – является получение препарата фибринолизина. Современные коммерческие препараты иммуноглобулина [5], изготовленные этаноловым методом по Кону, содержат в основном иммуноглобулин G и лишь небольшие количества иммуноглобулинов других классов, которые в процессе производства удаляются с балластными фракциями [9]. Балластная фракция III по Кону – осадок Б, выделяемая спиртовым фракционированием из плазмы крови, используется в качестве источника для получения препарата «Фибринолизин» [6, 129]. Первый отечественный метод получения фибринолизина из фракции III плацентарной сыворотки был предложен в 1961 г. Андреев Г. В. и Кудряшовым Б.А. Фибринолизин (Fibrinolysin) – белковый препарат, полученный из неактивного предшественника профибринолизина (плазминогена) путем его ферментативной активации трипсином [8, 22]. В основу метода получения профермента положен принцип кислотно-тепловой денатурации балластных белков, осаждаемых с неактивным предшественником фибринолитического фермента.

Технология человеческого лейкоцитарного интерферона предполагает получение продукта, содержащего не только интерферон, но и фракцию низкомолекулярных веществ, обладающих антибактериальным действием. Факт антибактериального действия препаратов лейкоцитарного интерферона был обнаружен в 80-х годах прошлого столетия. Известно, что антибактериальное действие катионных белков нейтрофилов и макрофагов на бактерии связано с нарушением в структуре и функциях клеточных стенок микроорганизмов их метаболизма. Кроме того, в результате экспериментов доказано, что катионные белки влияют на деполаризацию мембран, что

приводит к ряду физиологических изменений, вызывающих гибель бактериальных клеток [69].

Одним из факторов, участвующим в обезвреживании фагоцитируемых, находящихся внутри лейкоцитов бактерий, являются белковые компоненты крови и антибактериальные пептиды, продуцируемые лейкоцитами в процессе интерферогенеза. Получение их привлекательно тем, что они являются побочным продуктом синтеза интерферона. Кроме того, природное происхождение названных пептидов обуславливает отсутствие ряда нежелательных эффектов, присущих современным антибиотикам. Поэтому получение комплекса антибактериальных пептидов является перспективным для фармакологических исследований с целью создания на их основе новых лекарственных препаратов.

На базе филиала ФГУП «НПО «Микроген» Министерства здравоохранения Российской Федерации в г. Пермь «Пермского НПО «Биомед» разработан метод получения, концентрирования и очистки антибактериального пептидного комплекса (АБПК) с молекулярной массой до 5 кДа, изучены физико-химические характеристики препарата. Проведена оценка специфической активности лиофилизированной субстанции пептидного комплекса в отношении грамотрицательных и грамположительных бактерий. Установлено, что культуры как условно-патогенных, так и патогенных штаммов стафилококков особенно чувствительны к данной субстанции. Выделенный антибактериальный пептидный комплекс состоит из 16 аминокислот. Особенностью аминокислотного состава пептидного комплекса является присутствие аминокислот, обеспечивающих средство к фосфолипидам мембран бактерий, удельный вес которых суммарно составляет 20%, что, по-видимому, достаточно для обеспечения гидрофобных свойств молекул пептидов. Это объясняет наличие у выделенного пептидного комплекса антибактериальной активности в отношении грамотрицательной флоры, что является качеством, присущим далеко не всем катионным пептидам с антибактериальным действием. Проведенные исследования

подтвердили предположение о многофункциональности катионных пептидных субстанций, в частности, выделенный лейкоцитарный пептидный комплекс из побочных продуктов интерферона обладает наряду с антибактериальной активностью иммуномодулирующими свойствами [69]. В настоящее время ведутся исследования по усовершенствованию технологии АБПК.

Производство человеческого лейкоцитарного интерферона так же связано с получением отхода – «отработанных» лейкоцитов, из которых получают препарат аффинолейкин. Аффинолейкин – иммунокомпенсирующий препарат, содержащий антигенспецифичные белки Т-клеточного происхождения. При недостаточности клеточного иммунитета его введение восстанавливает угнетённую иммунореактивность на антигены повсеместно распространённых инфекционных возбудителей, таких как вирус простого герпеса, стафилококк, стрептококк, микобактерии туберкулёза, дрожжеподобные грибы и т. п. Препарат изогенен, вирусологически безопасен и не обладает противовоспалительной активностью. Препарат «Аффинолейкин» представляет собой комплекс низкомолекулярных компонентов экстракта донорских лейкоцитов, содержащий пептиды с молекулярной массой 5-8 кДа, в том числе трансфер-факторные пептиды, способные переносить *in vivo* и *in vitro* иммунореактивность к повсеместно распространённым антигенам [45, 46].

Для получения препарата «Аффинолейкин» исходное сырьё подвергается дезинтеграции и дифференциальной диафильтрации. Конечный продукт пастеризуют при 60 °С в течение 10 часов, стерилизуют мембранной фильтрацией и лиофилизируют [45, 69]. Поскольку на поверхности и внутри лейкоцитов может быть сосредоточен вирусный материал ввиду особенностей морфологии клеток, лейкоцитарная масса проходит обязательную процедуру карантинизации не менее 180 суток согласно приказу Министерства здравоохранения РФ от 7 мая 2003 г. № 193 «О внедрении в практику работы службы крови в Российской Федерации метода карантинизации свежезамороженной плазмы».

После заготовки крови и плазмы проводят определение специфической безопасности донорского сырья согласно Приказу МЗ РФ № 364 от 14.09.01 г. Основными показателями качества донорского сырья является отсутствие поверхностного антигена вируса гепатита В, антител к вирусу гепатита С, антител к вирусу приобретенного иммунодефицита человека (ВИЧ-1, ВИЧ-2), антител к возбудителю сифилиса, которые проводят иммуноферментным методом с использованием тест-систем, разрешенных к применению в практике здравоохранения России в соответствии с прилагаемыми к ним инструкциями по применению.

После карантинизации в случае выявления маркеров вирусных инфекций при повторном серологическом обследовании доноров крови замороженная лейкомакса уничтожается. Гарантией вирусологической безопасности аффинолейкина является предварительное обследование доноров и последующее наблюдение за ними, карантинизация сырья, ультрафильтрация и пастеризация полуфабрикатов.

Отходом производства интерферона является, кроме отработанных лейкоцитов, эритроцитарная масса, образующаяся на начальном этапе технологии. Далее рассмотрена возможность использования такого отхода и потенциал получения функциональных продуктов на его основе.

1.3. Аспекты переработки эритромаксы крови доноров

Полагаясь на приведенные выше факты о путях использования белковых отходов и препаратов на основе продуктов переработки белков, был рассмотрен вопрос о методах использования отхода технологии лейкоцитарного интерферона – эритромаксы.

Известно, что внутри эритроцитов происходит «нарезание» гемоглобиновых α - и β -цепей на серию крупных фрагментов (всего выделено 37 пептидных фрагментов α -глобина и 15 β -глобина) и, кроме того, эритроциты выделяют в окружающую среду множество более коротких пептидов. Пептидные пулы образуются и другими культурами клеток, например,

трансформированными миеломоноцитами, т. е. продукция пептидов культурами клеток – широко распространённый феномен. В большинстве тканей 30-90% всех идентифицированных пептидов являются фрагментами гемоглобина, однако идентифицированы и другие белки, порождающие «каскады» эндогенных пептидов – альбумин, иммуноглобулины и др. [120].

Изучение перечня пептидных фрагментов гемоглобина привело к выводу, что разнообразие эндогенных пептидов значительно превосходит традиционный набор пептидных гормонов, нейромодуляторов и антибиотиков. Изучено действие более 300 пептидов – компонентов пептидных пулов тканей млекопитающих – на культуры опухолевых и нормальных клеток. В результате оказалось, что более 75% этих пептидов оказывают выраженное пролиферативное или антипролиферативное действие хотя бы на одну культуру [120].

Необходимость получения и изучения продуктов на основе протеолитически деградированных эритроцитов возникла при анализе технологических параметров получения ЧЛИ. Производство ЧЛИ характеризуется большим количеством белкового отхода – эритромаcсы, образующейся в результате фракционирования донорской крови на предварительном этапе технологии при получении культуры чистых лейкоцитов. В настоящее время известен один способ использования такого отхода. В одной из работ (Ворошилова, 1992) описан способ кислотного гидролиза эритромаcсы с целью получения питательной среды для культивирования бактериофагов [15]. Учитывая множество недостатков способа кислотного гидролиза можно сказать, что поиск альтернативных методов переработки эритромаcсы с целью получения функциональных продуктов является перспективным.

В литературе имеются данные недавних исследований по ферментативному гидролизу белков эритромаcсы свиней [102, 106, 119, 126]. В частности, интерес вызывал способ рациональной утилизации отходов крови при бойне скота, предложенный коллективом исследователей Национального

Института республики Тайвань [112]. В своей работе они использовали эритроцитарную массу крови свиней после высокотемпературной обработки, подвергая ее ферментативному гидролизу. В качестве протеолитических ферментов использовали препараты «Alcalase», «Flavourzyme» (Дания) и растворы трипсина, химотрипсина и термолизина (США). Показано, что наибольшей степенью расщепления белка характеризовались гидролизаты, полученные под действием смеси вышеуказанного перечня ферментов. Процесс ферментативного гидролиза проводили 24 ч при средней температуре и значении pH активации ферментов – (45 ± 2) °C и 7,5 соответственно. По истечении времени гидролиза образцы выдерживали на водяной бане в течение 15 минут при температуре (90 ± 2) °C для деактивации ферментов. Продукты гидролиза центрифугировали при скорости ротора 23,4 тыс. об/мин в течение 15 минут, собирали надосадочную жидкость. Образцы хранили при температуре (4 ± 2) °C.

При анализе технологии, описанной выше, был сделан вывод о том, что тепловая обработка субстрата непосредственно перед ферментативным гидролизом существенно облегчает протеолиз, т.е. способствует увеличению степени расщепления белка и выходу готового продукта. В случае гидролиза эритромаcсы процедура предварительного глубокого замораживания сырья приводила к гемолизу эритроцитов; при этом контакт высвобожденных белков с ферментным препаратом происходил эффективнее и с более высокой скоростью, чем в случае с целыми клетками эритроцитов. Целью тепловой обработки белкового субстрата при температуре выше 60 °C до процесса гидролиза, по результатам авторов из Данмарк Протеин, являлась денатурация белка, приводящая к более эффективному гидролизу. Кроме того, подобным способом снижалось содержание бактерий перед инкубацией с ферментами [64].

Приведенные выше данные о способах гидролиза белковых субстратов описывают достаточно четкие перспективы их совокупного использования при утилизации эритромаcсы крови человека. Таким образом, основываясь на

результатах предыдущих опытов, метод получения гидролизатов эритромы массы крови человека может найти свое применение в технологии интерферона. К тому же экспериментальные факты, полученные в этой области к настоящему времени, касающиеся переработки эритромы массы донорской крови, показали возможность получения активных субстанций с высокой концентрацией аминного азота для приготовления питательных сред на их основе, которые подходят для культивирования перевиваемой клеточной линии SPEV.

Побочный продукт технологии ЧЛИ представлен не только массой эритроцитов, но и другими компонентами крови. Эритромы масса – биологический субстрат, на 95% состоящий из гемоглобина, содержащего все заменимые и незаменимые аминокислоты, кроме изолейцина, недостаток которого компенсируют другие остаточные компоненты крови [52]. Продукты гидролиза эритромы массы в зависимости от способа (кислотный, ферментативный) могут иметь разный качественный состав. При этом только протеолитическое расщепление конечного продукта сохраняет исходный полноценный композит сырья, поскольку такой процесс проходит в мягких, близким к физиологическим условиях, не вызывая разрушения и рацемизации аминокислот.

Существует гипотеза Иванова В. Т. о специфическом пептидном пуле, который происходит из функционально активных высокомолекулярных белков путем их тканеспецифичного ферментативного гидролиза до пептидов определенного размера [111]. Гемоглобин служит примером одного из таких белков-предшественников. Уже более 50 лет назад было доказано, что образующиеся из гемоглобина пептидные молекулы обладают широким спектром биологической активности – опиоидной (действие на ЦНС), антипролиферативной (за счет геморфинов и их способности регулировать размножение опухолевых клеток), эритропоэтиновой (стимуляция синтеза эритроцитов) [92, 128]. При этом геморфины – эндогенные регуляторные пептиды гемоглобина – обладают свойствами, сходными с ангиотензинами (в том числе в отношении ускорения репарационных процессов в поврежденных

тканях) [118, 122]. Возможно, именно эти пептиды, широко представленные в тканях и секретируемые эритроцитами, играют непосредственную роль в противоопухолевой защите организма. На примере использования геморфинов показано, что фрагменты гемоглобина могут обладать высокой цитотоксичностью и антипролиферативной активностью в опухолевых клетках, при этом не характеризуясь выраженной токсичностью для нормальных клеток. По данным М. М. Филлиповой и соавторов [92] лизис гемоглобина осуществляется комплексом высокоспецифических протеаз, локализованных на внутренней стороне мембраны эритроцита. Точные механизмы активации данного комплекса ферментов в настоящее время неизвестны. Обзор литературы показывает, что в результате ограниченного протеолиза биологически активного белка-предшественника – гемоглобина, образуются пептиды, модулирующие функции иммунной, нервной, эндокринной, сердечно-сосудистой и других систем организма [131]. Однако каталитическое расщепление функциональных белков, приводящее к образованию биологически активных пептидов, может происходить лишь при наличии в организме воспаления, приводящего к резкому изменению кислотности среды и активации кислых протеаз – ферментов с оптимумом активности при низком значении рН [44].

По мнению исследователей [92] основной функцией тканеспецифического пептидного комплекса служит контроль трансформации, пролиферации и элиминации клеток соответствующей ткани. Исключительная важность регуляторов пептидной природы предполагает наличие сложнорегулируемого механизма деградации функциональных белков в клетках. Изучены пептидные соединения, образующиеся в культурах эритроцитов человека, предшественниками которых является гемоглобин и некоторые другие белки клеток. Точная локализация, состав, а также механизмы действия комплекса протеолитических ферментов в эритроцитах в настоящее время не изучены.

По одной гипотезе, пептиды образуются внутри эритроцитов, а затем выводятся из клеток; по другой – из эритроцитов экскретируются длинные

фрагменты, из которых затем в плазме с помощью плазменных протеаз образуются короткие пептиды. Существует также точка зрения, по которой образование коротких пептидов из длинных предшественников связано с действием на них мембраноассоциированного ферментативного комплекса при их прохождении через мембрану [92]. Открытая эндокринная функция эритроцитов требует выяснения механизмов образования биологически активных пептидов этими клетками, так как, во-первых, молекулы поступают непосредственно в кровь и оказывают генерализованное действие, а во-вторых, данные клетки не имеют внутриклеточных мембранных структур для локализации активных протеаз. Соответственно, в этих клетках комплекс ферментов, расщепляющих белки, должен иметь механизмы активации и ингибирования. Возможно, этот процесс генерации пептидов в эритроцитах подвергается сложной регуляции с помощью сигнальных молекул, действующих как извне, так и образующихся внутри клеток. Однако сведений о действии сигнальных молекул на образование пептидов в эритроцитах человека нет.

В одной из работ Кленовой (2007) [29] описан процесс выделения пептидных фракций гемоглобина. Деградацию гемоглобина проводили под действием пепсина по методу Асатиани, инкубируя препараты его с пепсином в течение 4 часов в термостате при (37 ± 1) °С. Гемоглобин и другие белки осаждали 10% раствором трихлоруксусной кислоты (ТХУ). В надосадочной жидкости определяют содержание пептидных соединений по методу Лоури [121] и по УФ-поглощению при длине волны 254 нм. Так же исследовали ТХУ-центрифугаты проб на наличие пептидных соединений. Установлено, что среди пептидных соединений, образуемых эритроцитами, присутствуют фрагменты гемоглобина. Молекулярная масса полученных групп пептидных соединений колебалась в пределах от 0,7 до 3,0 кДа для коротких пептидов и от 3 до 20 кДа для длинных молекул. По результатам исследований Кленовой (2009) [30] сравнение данных гель-хроматографии и электрофореза пептидных центрифугатов с учетом различий в скорости элюции пептидных соединений

через поры разных сорбентов, позволило предположить, что общий пик, характерный для всех эритроцитарных центрифугатов, содержал пептидные соединения молекулярной массы более 3 кДа (от 3 до 20 кДа).

В литературном обзоре рассмотрен перечень технологий, предполагающих использование белковых отходов в качестве исходного сырья для получения биологически активных субстанций. Рассмотрены конкретные пути применения продуктов переработки отходов. Подробно описаны пути применения отходов производства препаратов человеческой крови, в частности, интерферона альфа. Поиск методов выделения высокоспецифичной пептидной субстанций из эритроцитарной массы является перспективной областью исследований. Данная работа посвящена оптимизации метода гидролиза, очистки и выделения пептидного комплекса из эритроцитарной массы крови человека с целью изучения перечня биологических свойств: пролиферативных, ростостимулирующих, антибактериальных и др.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Объекты исследований

Объектами настоящего исследования служили:

- исходное сырье – эритромаасса (побочный продукт производства ЧЛИ на Пермском НПО «Биомед»);
- ферментативные гидролизаты эритромаассы;
- клеточная линия эпителиальной ткани почки эмбриона свиньи (SPEV) по ФС 42-3724-99;
- культура рекомбинантного светящегося штамма *E.coli Lum+*;
- культуры аэробных условно-патогенных микроорганизмов;
- лабораторные животные (морская свинка гладкошерстная).

2.2. Материалы исследований

- трипсин сухой с активностью до 1500 единиц на 1 мг белка («Sigma», USA);
- раствор трипсина 0,25% с 1мМ ЭДТА («Invitrogen», USA);
- сухой пепсин свиной с активностью 250 единиц на 1 мг белка («Sigma», USA);
- раствор Версена производства предприятия бактериальных и вирусных препаратов им. Чумакова, Россия, по ТУ 9385-087-14237183-08
- питательная среда 199 производства предприятия бактериальных и вирусных препаратов им. Чумакова, Россия, по ТУ 9385-009-01895045-2007;
- Сыворотка КРС для культур клеток жидкая, стерильная производства ООО "Биолот", г. Санкт-Петербург, по ТУ 8265-0009-01895016-2007;
- канамицина сульфат производства ОАО «Биохимик», г. Саранск.
- вода очищенная по ФС 42-2619-97;
- хлористоводородная кислота раствор 0,1 М по ГОСТ 25794.1;
- хлористоводородная кислота раствор 1,0 М по ГОСТ 25794.1;

- натрия гидроксида раствор 0,1 М по ГОСТ 25794.1
- натрия гидроксида раствор 1,0 М по ГОСТ 25794.1
- натрия хлорида раствор 0,9% по ГОСТ 4517-87;
- бикарбонат натрия раствор 7,5% по ГОСТ 2156-76;
- спирт этиловый 70% по ГОСТ 5964-93;
- перекись водорода 33% по ГОСТ 10929-76.

Оценку стимуляции скорости роста ворса полученных образцов гемодеривата проводили на 40 морских свинках гладкошерстных 3-х месячного возраста, массой не (250 ± 50) г. Все животные находились в питомнике НПО «Биомед» на стандартном рационе питания. Исследования проводили в соответствии с международным соглашением об экспериментах на животных.

2.3. Методы исследований

2.3.1. Физико-химические методы

Определение количества эритроцитов проводили унифицированным методом [40]. Количество клеток подсчитывали в камере Горяева по стандартной методике с целью контроля их гемолиза после процедуры замораживания-дефростации.

Содержание гемоглобина в эритроmasсе определяли гемиглобинцианидным методом [49].

Содержание аминного азота определяли методом формольного титрования [50]. Принцип метода основан на блокировании формальдегидом при $pH=7,0$ свободных аминогрупп и титровании раствором гидроксида натрия эквивалентного количества карбоксильных групп. Начало и конец титрования определяли потенциометрически.

Для определения содержания хлорид-ионов белки окисляли марганцевокислым калием в кислом растворе [50]. Хлорид натрия взаимодействовал с азотнокислым серебром, избыток которого оттитровывали роданидом аммония.

Присутствие белков и высокомолекулярных соединений пептидной природы контролировали в реакции с трихлоруксусной кислотой путем добавления по каплям к исследуемому образцу. Отсутствие осадка и опалесценции означало полную депротеинизацию раствора низкомолекулярных пептидов [29].

Протеолитическую активность пепсина в очищенных препаратах гемодеривата контролировали в качественной реакции протеолитического расщепления и просветления раствора нормальной лошадиной сыворотки [35, 75]. Методика:

1. Готовили 10 % раствор сульфосалициловой кислоты;
 2. Готовили разведенную сыворотку из нормальной лошадиной с известной концентрацией белка. Концентрация белка в разведенной сыворотке должна быть 0,5 %; нагревали разведенную сыворотку на водяной бане до температуры (40 ± 2) °С. При перемешивании доводили значение рН до $(2,0 \pm 0,1)$, медленно добавляя 10 % раствор сульфосалициловой кислоты.
 3. Готовили 2 раствора: пепсина и гемодеривата. Для этого 0,2 г вещества растворяли в 100 мл 0,01 М хлористоводородной кислоты.
 4. Проводили реакцию: ставили в штатив 2 ряда по 7 пробирок, предварительно подписанных: 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; 0,6; контроль.
 5. Наливали в каждую пробирку, кроме контроля, соответственный обозначению объем исследуемых растворов в мл: в 1-ый ряд – раствор пепсина, во 2-ой ряд – раствор гемодеривата. Доводили объем каждой пробирки до 1 мл, включая контроль, очищенной водой.
 6. В каждую пробирку, включая контрольную, добавляли по 5 мл раствора сыворотки с 10 % раствором сульфосалициловой кислоты. Перемешивали.
 7. Помещали штатив с пробирками на водяную баню при температуре (40 ± 1) °С на 30 минут
- Учет результатов проводили визуально. Отмечали пробирки, где наблюдалось наибольшее просветление раствора. Сравнивали результаты действия раствора гемодеривата и пепсина в соответствующих разведениях.

Концентрацию перекиси водорода определяли титрацией с перманганатом калия [41]. Объем 10 мл исследуемого раствора гемодеривата после стабилизации сушкой (40 мг/мл) помещали в мерную колбу емкостью 100 мл и доводили объем раствора до метки очищенной водой. К 10 мл полученного раствора прибавляли 5 мл 3 % раствором серной кислоты и титровали 0,1 М раствором перманганата калия до появления слабо розового окрашивания. Процентную концентрацию остаточной перекиси водорода определяли по формуле:

$$C_{\%H_2O_2} = \frac{T_{KMnO_4/H_2O_2} * V_{KMnO_4} * 100\%}{V_{об}}, \text{ где}$$

T_{KMnO_4} – постоянная величина 0,0017;

V_{KMnO_4} – объем перманганата калия, необходимого для появления розового окрашивания;

$V_{об}$ – объем исследуемого образца.

Известно, что раствор перманганата калия способен окислять белки. Поскольку в составе раствора гемодеривата белки отсутствовали, методику применяли без ограничений.

Молекулярную массу пептидов определяли методом ВЭЖХ с использованием хроматографических колонок фирмы «Knauer» с сорбентом Диасфер-110-Диол при длине волны 280 нм [107].

Аминокислотный состав определяли методом кислотного гидролиза гемодеривата в герметичных ампулах в атмосфере азота в 6М HCl при $t=105\text{ }^{\circ}\text{C}$ в течение 24 ч. Кислоту отгоняли, трижды промывая образец деионизированной водой. Сухой остаток экстрагировали 0,2 М натрий-цитратным буфером, рН=2,2. Параллельно проводили анализ стандартной смеси для гидролизатов белков. Расчет делали сравнением высоты или площади пиков образца с высотой или площадью пиков в стандартном растворе с содержанием 12,5 нл каждой аминокислоты в 0,1 мл, наносимом на колонку анализатора аминокислот Т339 (Чехия). Исследование проводили в г. Пущино в институте биохимии и физиологии микроорганизмов имени Г.К. Скрыбина РАН.

Сублимационное высушивание замороженного раствора гемодеривата в кассетах проводили в сублимационной установке ТГ-50. Перед работой проводили подготовку и внешний осмотр установки, проверяли ее комплектность и исправность, отсутствие видимых поломок и повреждений. Контролировали температуру полок – не выше минус 20 °С.

Производили загрузку кассет с замороженным препаратом в сублимационную установку из низкотемпературной камеры для начала процесса лиофилизации. После стабилизации вакуума не выше 13,3 Па через 1 час после начала лиофилизации задавали с помощью измерителя-регулятора нагрев полок до 0 °С и далее по 5 °С в час. Конечная температура нагрева полок (37±3) °С поддерживалась до конца процесса лиофилизации. В продолжение всего процесса лиофилизации вакуум должен быть не более 16,0 Па, температура пластин конденсатора не выше минус 50 °С. После выдерживания продукта на плюсовой температуре не менее 25 часов процесс лиофилизации завершали. Продолжительность сублимационного высушивания (60±5) ч. По окончании процесса лиофилизации закрывали задвижку между сублимационной камерой и конденсатором, выключают вакуумные насосы, компрессоры охлаждения пластин конденсатора. Кассеты с высушенным препаратом вручную выгружали в эксикаторную емкость под вакуумом от минус 0,8 до минус 1,0 кгс/см² не более 72 ч. После сублимации взвешивали массу сухого осадка гемодеривата.

2.3.2. Биологические методы

Оценивали антибактериальную активность гемодеривата при действии на культуру рекомбинантного светящегося штамма *E.coli lum+* «Эколюм». Оригинальный метод заключался в определении токсического действия веществ, таких как тяжелые металлы, их соли и др., по уровню интенсивности свечения штамма *E.coli lum+*. В данной работе метод использовали для определения изменения интенсивности свечения рекомбинантного штамма *E.coli lum+* при воздействии на него исследуемой пробы гемодеривата по

сравнению с контролем. Поскольку в растворе гемодеривата отсутствуют распространенные токсиканты, а присутствуют лишь низкомолекулярные пептиды, применение данной методики целесообразно проводить для оценки не токсического, а антибактериального действия исследуемого раствора. Критерием антибактериального действия гемодеривата явилось изменение интенсивности биолюминесценции тест-объекта в исследуемой пробе по сравнению с контрольной, содержащей физиологический раствор.

Уменьшение интенсивности биолюминесценции считали пропорциональным антибактериальному эффекту. Антибактериальное действие исследуемой пробы гемодеривата определяется по ингибированию биолюминесценции бактерий через 0,5; 1; 2; 4; 24 ч экспозиции. При определении антибактериальной активности гемодеривата проводили параллельное измерение уровня биолюминесценции контрольных и опытных проб. Выполняли не менее трех повторов опытной пробы для получения усредненного значения интенсивности биолюминесценции. Все операции совершали согласно процедурам, изложенным в оригинальной методике [16].

Оценку антибактериальной активности пробы гемодеривата проводили по относительному различию в интенсивности биолюминесценции контрольной и опытной проб и вычислению индекса подавления биолюминесценции. Абсолютная величина интенсивности биолюминесценции контроля не имела принципиального значения в диапазоне допустимых значений прибора "Биотокс". Количественная оценка параметра тест-реакции выражалась в виде индекса подавления биолюминесценции T – безразмерной величины, рассчитываемой по формуле:

$$T = 100 (I_0 - I) / I_0,$$

где I_0 и I – интенсивность свечения контроля и опыта, соответственно, при фиксированном времени экспозиции исследуемой пробы с тест-объектом.

Допускали, как и в оригинальной методике, три пороговых уровня индекса подавления биолюминесценции:

1. низкая антибактериальная активность при подавлении биолюминесценции менее, чем на 20%;
2. средняя антибактериальная активность при подавлении свечения от 20 до 50%;
3. выраженная антибактериальная активность при подавлении свечения более, чем на 50%.

Проводили определение чувствительности микроорганизмов к гемодеривату методом серийных разведений в жидкой питательной среде. Определяли чувствительность культур условно-патогенной аэробной микрофлоры, представленной различными штаммами *S. epidermidis*, *S. aureus*, *E.coli*, *P. aeruginosa*, а так же минимальную действующую концентрацию раствора гемодеривата. Концентрация суспензии каждого микроорганизма составляла не менее $1,5 \times 10^8$ КОЕ/мл. Исследование проводили в соответствии с методическими указаниями по определению чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам [55].

Определяли токсичность гемодеривата при действии на перевиваемую клеточную линию эпителиальной ткани почки эмбриона свиньи (SPEV). Данную клеточную линию можно бесконечно размножать *in vitro* путем пересевания после цикла культивирования, например, в стеклянном флаконе, расположенном горизонтально. Причем культура способна образовывать монослой по всей внутренней поверхности флакона, покрытой питательной средой. Работа по культивированию перевиваемой клеточной линии SPEV проводилась в боксе клеточных культур в шкафу с ламинарным потоком воздуха. Для посева брали 3-4-дневный монослой культуры клеток SPEV. Перед снятием монослоя матрас с культурой клеток просматривали в микроскоп при 100-кратном увеличении. Клеточный монослой должен быть тонким, ровным.

В шкаф с ламинарным потоком воздуха помещали стерильные пипетки, пустые флаконы, пробки, флаконы со средой 199, с сывороткой крупного рогатого скота, флаконы с антибиотиками, с 0,25 % раствором трипсина, с

раствором Версена. Для культивирования клеток использовали стеклянные флаконы объемом 400 мл. Горлышко флакона, содержащего клеточную культуру SPEV, подлежащую пассированию, обрабатывали тампоном, смоченным 96% раствором спирта этилового, обжигали в пламени спиртовки, пробку снимали, используя корнцанг. Из флакона сливали старую среду роста в емкость для слива, монослой клеток ополаскивали питательной средой 199, содержащей 10 % сыворотки крупного рогатого и 100 мкг/мл канамицина сульфата. В матрац вносили (50 ± 5) мл смеси раствора Версена и раствора трипсина в соотношении 3:1, подогретых в термостате при температуре $(37,0 \pm 1,0)$ °С в течение 2 часов. Через 1-2 мин раствор выливали. Клеточную взвесь ресуспендировали в 10 мл среды роста, пипетировали до 30 раз. Брали пробу клеточной взвеси в количестве 0,1 мл для подсчета в камере Горяева. Подсчет клеток вели во всей камере и по формуле рассчитывали общее количество клеток во флаконе:

$$X = p \times 1100 \times 10, \text{ где}$$

X – количество клеток в 10 мл взвеси;

p – число клеток в камере Горяева;

1110 – коэффициент пересчета;

10 – объем клеточной взвеси.

Для получения следующего пассажа клеток и формирования монослоя делали пересев клеток с концентрацией 50 тыс. кл/мл на новый матрац, добавляли 50 мл среды роста – питательной среды, содержащей гемодериват или контрольной – среды 199, закрывали стерильной пробкой. Матрац помещали в термостат при температуре $(37,0 \pm 1,0)$ °С на 3 суток. Для получения монослоя клеточной линии SPEV для контроля специфической активности интерферона взвесь клеток, содержащую до $25 \cdot 10^4$ кл/мл, вносили с помощью дозатора по 0,2 мл в лунки 96-луночных стерильных планшетов с плоским дном. Культуру клеток в планшетах инкубировали при температуре $(37,0 \pm 1,0)$ °С в атмосфере, содержащей 5 % CO₂ и (60-70) % влажности. Через 48 часов

планшеты просматривали в инвертированном микроскопе. В работу брали планшеты с хорошо сформированным монослоем.

Все компоненты, используемые во время работы с клеточной культурой (клеточная взвесь, среда 199, сыворотка крупного рогатого скота, смесь трипсина и Версена, среда роста), после работы контролировали на стерильность – 1 мл раствора засекали на 10 мл тиогликолевой среды. Посев производили на 4 пробирки. Две пробирки выдерживали в термостате при (22 ± 2) °C и две в термостате при температуре (32 ± 2) °C в течение 14 суток. В течение этого времени посева просматривали через 2-3 суток. Испытуемые компоненты должны быть стерильными.

Определение токсичности раствора гемодеривата проводили в соответствии с методикой определения токсичности полуфабриката человеческого лейкоцитарного интерферона, изложенной в фармакопейной статье [93] с использованием перевиваемой клеточной линии SPEV. Оценивали токсичность образцов раствора гемодеривата с концентрацией 40 мг/мл по сухому веществу. В качестве контрольной среды роста клеток применяли питательную среду 199. Клетки линии SPEV выращивали в 96-луночных планшетах с плоским дном. В лунки с монослойной культурой вносили по 0,1 мл исследуемых образцов гемодеривата в разведении 1:50 в питательной среде 199, содержащей 10% сыворотки крупного рогатого скота и 100 мкг/мл канамицина сульфата. Использовали 3 лунки на каждую пробу. В 3 лунки с контрольной культурой вносили питательную среду без гемодеривата.

Культуры с гемодериватом и контрольные выдерживали 48 часов при температуре $(37,0\pm 1,0)$ °C в атмосфере 5 % углекислого газа, влажности (60-70) %, после чего просматривали под микроскопом при 100-кратном увеличении. Клеточный монослой должен быть неповреждённым, без признаков дегенерации, не отличаться от контрольных проб. При наличии признаков дегенерации в опытных лунках контроль повторяли.

Определяли специфическую активность питательной среды, содержащей гемодериват, методом пассирования клеточной линии SPEV. Питательная

среда, содержащая гемодериват, должна обладать большей ростовой активностью по сравнению с таковой на контрольной среде, определяемой по срокам формирования монослоя и ИП паспортизированной линии клеток SPEV, полученной из ассоциации клеточных культур, и не оказывать токсического действия на клетки. В качестве контрольной выступала среда 199, традиционно используемая в технологии интерферона при культивировании линии клеток SPEV.

На основе 199 среды готовили экспериментальные питательные среды, содержащие определенное количество раствора гемодеривата (20 мг/мл). Среда №1 содержала 50% среды 199 и 50% раствора гемодеривата, среда №2 – 75% среды 199 и 25% раствора гемодеривата, среда №3 – 85% среды 199 и 15% раствора гемодеривата. Добавляли 10% сыворотки крови крупного рогатого скота жидкой для культур клеток и антибиотик 100 мкг/мл канамицина сульфата, доводили стерильным раствором натрия бикарбоната 7,5 % до $pH=(7,2\pm 0,2)$. Культивирование клеточной линии SPEV проводили по стандартной методике.

Оценивали ростовые (пролиферативные) свойства питательной среды, считая количество клеток и ИП. Среда, содержащая гемодериват, считалась пригодной, если клетки прикреплялись к стеклу на первые сутки после засева и к третьим суткам культивирования формировали монослой без признаков дегенерации. Значение ИП должно быть не менее 4 после 5-го пассажа. Пример расчета:

$$ИП = K / C \text{ исх.};$$

где

K – общее количество клеток во флаконе, 12 900 000;

C исх. – начальная нагрузка на матрац, 3 000 000 клеток.

$$ИП = 12900000 / 3\ 000\ 000 = 4,3$$

ИП=4,3 удовлетворяет предъявляемым требованиям.

При оценке противовирусной активности интерферона использовали вирус везикулярного стоматита (VSV), способного размножаться в клетках

линии SPEV. Предварительно проводили контроль стерильности и инфекционности вирусосодержащей жидкости.

Контролировали стерильность аллантоистной жидкости, содержащей VSV, методом прямого посева: 1 мл вирусосодержащей аллантоисной жидкости засекали на 10 мл тиогликолевой среды. Посев производили на 4 пробирки. Две пробирки выдерживали в термостате при (22 ± 2) °C и две в термостате при температуре (32 ± 2) °C в течение 14 суток. Вирусосодержащая аллантоистная жидкость должна быть стерильной.

Для контроля инфекционности VSV использовали перевиваемую клеточную линию SPEV. В пенициллиновых флаконах готовили разведение вируса в питательной среде 199 с 10^{-1} до 10^{-6} . Из планшета с монослоем клеток удаляли питательную среду и вносили разведения вируса по 0,1 мл, используя по 4 лунки на каждое. Культуру клеток в планшетах инкубировали при температуре $(37,0 \pm 1,0)$ °C в атмосфере, содержащей $(5,0 \pm 0,5)$ % CO₂, влажности (65 ± 5) %. Через 24 часа планшет просматривали с помощью инвертированного микроскопа при 100-кратном увеличении и оценивали степень деструкции клеток под действием вируса по четырехкrestной системе:

минус (-) – полная защита клеток, нет дегенерации;

4 плюса (++++) – деструкция всех клеток в лунке;

3 плюса (+++) – деструкция 3/4 клеток в лунке;

2 плюса (++) – деструкция половины клеток;

1 плюс (+) – деструкция меньше половины клеток, единичные клетки с признаками дегенерации.

За инфекционный титр вируса (активность) принимали величину, обратную разведению препарата, при котором клеточная культура в 50% лунок оказалась полностью пораженной цитопатическим действием вируса. Активность вируса вычисляли методом Спирмена-Кербера по формуле:

$$\lg ED_{50} = D_{\max} + d/n * (p - n/2),$$

где D_{\max} – десятичный логарифм разведения, выше которого произошла 100% гибель клеток (+);

d – десятичный логарифм интервала между разведениями (1,0);

n – число лунок на каждую дозу (4);

r – число лунок, давших гибель (+) в D_{max} и последующих разведениях.

Пример:

10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}
+	+	+	+	+	+
+	+	+	+	+	+
+	+	+	+	+	-
+	+	+	+	+	-

$$\lg ED_{50} = \lg 10^6 + \frac{1}{4} * (2 - 4/2) = 6 + 0 = 6$$

$$\text{Титр вируса} = 10^6$$

Вирус везикулярного стоматита, который можно использовать в качестве индикатора при определении специфической активности интерферона, должен иметь инфекционный титр не ниже 10^4 ТЦД₅₀/мл.

Качество клеток, полученных при культивировании на среде, содержащей гемодериват, оценивали по возможности их применения для оценки противовирусной активности полуфабриката производственного интерферона. Для определения активности полуфабриката интерферона готовили двукратные разведения исследуемого образца полуфабриката интерферона и стандартного образца активности в питательной среде 199, содержащей 100 мкг/мл канамицина сульфата. На каждое разведение использовали 4 лунки. В лунки планшетов засевали клетки SPEV, полученные путем культивирования на экспериментальной питательной среде с гемодериватом и на контрольной среде 199.

Из лунок планшетов со сформированным монослоем клеток SPEV удаляли питательную среду и вносили по 0,1 мл приготовленных разведений интерферона. 4 лунки с культурой и средой оставляли в качестве контроля клеточной ткани. Кроме того, 16 лунок оставляли для контроля дозы вируса-индикатора, в которые вносили по 0,1 мл питательной среды.

Инокулированные и контрольные культуры клеток инкубировали 24 ч при $(37,0 \pm 1,0)^\circ\text{C}$ в атмосфере 5 % CO_2 , затем в каждую лунку с исследуемыми образцами вносили определенную дозу вируса везикулярного стоматита, соответствующую 100 ТЦД 50/0,1 мл. Контроль взятой дозы вируса осуществляют на предназначенных для этой операции 16 лунках с монослоем – по 4 лунки на каждое разведение вируса, начиная с разведения, соответствующего 100 ТЦД50/0,1мл, до разведения, соответствующего 0,1 ТЦД50/0,1мл, с коэффициентом разведения, равным 10. После внесения индикаторного вируса и титрования его дозы, культуру клеток инкубировали (24-48) ч при температуре $(37,0 \pm 1,0)^\circ\text{C}$ в атмосфере 5 % CO_2 .

Учёт специфической активности полуфабриката интерферона осуществляли через 48 ч, когда доза внесенного вируса соответствовала 100 ТЦД50/0,1мл. Учёт результатов проводили при отсутствии дегенерации в контрольной культуре. За титр интерферона принимали величину, обратную разведению препарата, при котором клеточная культура в 50% лунок была полностью защищена от цитопатического действия вируса.

Пересчет активности в МЕ осуществлялся по формуле:

Активность стандарта в МЕ

$$X \text{ (МЕ/мл)} = \text{Титр образца (Ед/мл)} \times \frac{\text{Активность стандарта в МЕ}}{\text{Титр стандарта в Ед/мл}}$$

Оценивали и сравнивали активность интерферона на клетках, полученных при культивировании на среде с гемодериватом и на контрольной среде.

Для определения биологических свойств гемодеривата с использованием модели морской свинки на сначала проводилось вычисление времени испарения растворов гемодеривата. Рассчитывали время испарения раствора гемодеривата 20 мг/мл по сухому веществу с использованием в качестве растворителей воду очищенную и спирт этиловый 70%. Растворы наносили на предметные стекла путем растирания наконечником дозатора. Объем образца раствора – 50 мкл, площадь 4 см². Вычисляли время, за которое поверхность стекла становилась сухой.

С помощью данного опыта устанавливали образец с наименьшим временем испарения, что означало наиболее комфортное нанесение на кожный покров в дальнейших исследованиях ростостимуляции с использованием животных – морских свинок. Этот факт учитывали, поскольку на общем состоянии животных может негативно сказывается множество факторов, в том числе и нервное переживание даже физически здоровых особей [38].

Исследовали кожно-раздражающее действие раствора гемодеривата. Использовали опытную и интактную (контрольной) группу, включающую по 10 морских свинок каждая, гладкошерстных 3-х месячного возраста светлой масти, массой не более 300 г. Условия содержания обеих групп были одинаковыми. Нанесение препарата и оценку его действия проводили в соответствии с методом накожных аппликаций, изложенным в методических рекомендациях по оценке алергизирующих свойств фармакологических средств [57].

Опыт включал в себя предварительное удаление 2-х зон волосистой части спины животного без извлечения корня волоса путем выбривания так, чтобы были видны четкие границы контрольных участков (рис. 1).

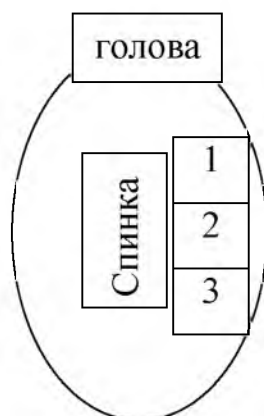


Рис. 1 Схема расположения зон нанесения препарата и контроля на кожном покрове морской свинки.

- 1- раствор гемодеривата водный;
- 2- полоса волос;
- 3- контроль (без нанесения).

Размеры зон 1 и 3 были одинаковыми, площадь каждой не превышала 4 см², размер зоны 2 – не более 1 см². За сутки до опыта проводилось

выстригание с использованием ножниц с последующим выбриванием при помощи одноразового бритвенного станка вдоль позвоночника животного с правой или левой стороны ближе к голове так, чтобы исключить досягаемость пасти. Пробу раствора гемодеривата с концентрацией сухих веществ 20 мг/мл и объемом 10 мкл наносили в течение 14 дней по 20 повторов за одну аппликацию (200 мкл в день). Реакцию кожи учитывали ежедневно по шкале оценки кожных проб:

- 0 – видимой реакции нет;
- 1 – бледно-розовая эритема по всему участку или по его периферии;
- 2 – ярко-розовая эритема по всему участку или его периферии;
- 3 – красная эритема по всему участку;
- 4 – инфильтрация и отек кожи (утолщение кожной складки) при наличии или отсутствии эритемы;
- 5 – эритема, выраженная инфильтрация, очаговые изъязвления (некроз), возможны геморрагии, образование корочек.

Далее оценивали свойство раствора гемодеривата стимулировать роста волос. Использовали раствор гемодеривата в спирте этиловом (70%). В качестве контроля применяли спирт этиловый (70%). Исследование проводили с использованием опытной и интактной (контрольной) групп, включающих по 10 морских свинок каждая, гладкошерстных 3-х месячного возраста светлой масти, массой (250±50) г. Условия содержания обеих групп были стандартными. Исходная длина ворса животных на исследуемых зонах не превышала 15 мм; через месяц от начала исследований длина увеличилась и составляла не более 18 мм. Опыт продолжали в течение 4-х недель.

За сутки до опыта проводили выстригание с использованием ножниц с последующим выбриванием при помощи одноразового бритвенного станка вдоль позвоночника животного с правой или левой стороны ближе к голове так, чтобы исключить досягаемость пасти, или перорального попадания препарата. При этом зоны смазывания располагались по возможности рядом для удобства визуального сравнения, разграничиваясь полосой ворса (не выбритой).

Наносили растворы согласно описанию и схеме, изображенной на рис. 1 (см. выше методику определения кожно-раздражающего действия раствора гемодеривата), с той разницей, что:

- 1- раствор гемодеривата спиртовой (70%);
- 2- полоса волос;
- 3- контроль (растворитель – 70% спирт).

Размеры зон 1 и 3 были одинаковыми, площадь каждой не превышала 4 см², размер зоны 2 – не более 1 см². Объем наносимой пробы спиртового раствора гемодеривата, как и контроля, составляла 50 мкл в сутки. Препарат и контроль наносили с помощью наконечника дозатора согласно рис. 1, дожидаясь полного высыхания. Длины ворсинок оценивали с помощью штанген-циркуля на темном фоне (черный картон).

Так же проводили бактериологический контроль стерильности раствора гемодеривата. Объем 1 мл рабочего раствора засекали на 10 мл тиогликолевой среды. Посев производили на 4 пробирки. Две пробирки выдерживали в термостате при (22±2) °С и две в термостате при температуре (32±2) °С в течение 14 суток. В течение этого времени посеvy просматривали каждые 2-3 суток. Испытуемые растворы должны быть стерильными.

2.3.3. Вирусологический контроль

Основными показателями качества донорского сырья является отсутствие поверхностного антигена вируса гепатита В, гепатита С, антител к вирусу приобретенного иммунодефицита человека (ВИЧ-1, ВИЧ-2), к возбудителю сифилиса [58], контроль которых проводили иммуноферментным методом с использованием тест-систем, разрешенных к применению в практике здравоохранения России в соответствии с прилагаемыми к ним инструкциями по применению согласно Приказу МЗ РФ № 364 от 14.09.01 г. "Об утверждении порядка медицинского обследования донора крови и ее компонентов" и Приказу МЗ РФ от 16.04.08 г. № 175н «О внесении изменений в приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации от 14.09.01 г. № 364

«Об утверждении Порядка медицинского обследования донора крови и ее компонентов».

2.4. Статистический анализ результатов

Полученные результаты обрабатывали методами вариационной статистики. Достоверность различий между группами оценивали с помощью t-критерия Стьюдента. Различия считались статистически значимыми при $p < 0,05$. Все результаты в таблицах и на рисунках в виде средней арифметической и ее стандартной ошибки ($M \pm m$).

ГЛАВА 3. Разработка технологии гемодеривата и оценка его физико-химических свойств

Технология человеческого лейкоцитарного интерферона, применяемая на ФГУП «НПО «Микроген» Министерства здравоохранения Российской Федерации в г. Пермь «Пермском НПО «Биомед» предполагает наличие белкового отхода – эритроциты крови человека. В настоящее время на предприятии нет разработок, касающихся методов утилизации эритроциты с извлечением выгоды, что неоправданно не только с экономической, но и с экологической точки зрения.

В данном разделе представлены материалы, касающиеся исследований о выявлении потенциальной возможности получения функциональных продуктов на основе отхода – эритроциты. Эритроциты, получаемая в процессе изготовления интерферона, характеризуется высоким содержанием белка гемоглобина, около 350 г/л. Это делает перспективным процесс получения гидролизата на ее основе. Нами были изучены образцы эритроциты крови, полученной путем фракционирования лейкоэритроциты в процессе производства природного интерферона. В табл. 1 даны результаты физико-химического анализа отхода технологии ЧЛИ – эритроциты по основным показателям: значение pH, содержание аминного азота, содержание хлоридов (n=5, P=0,95).

Таблица 1

Физико-химический анализ отхода технологии ЧЛИ – эритроциты
человеческой крови

Показатель	Значение
С гемоглобина*, г/л	320±17
pH	6,81±0,2
Аминный азот, мг%	254,8±3,8
Хлориды, %	0,86±0,1

* – концентрация гемоглобина в цельной эритроциты

Из материалов, представленных в табл. 1, следует, что отходу производства интерферона – эритроmasсе присуще высокое содержание аминного азота, а содержание хлоридов и значение рН – на физиологическом уровне. Высокое содержание белка говорит о наличии биотехнологического потенциала при его деструкции. Данные свидетельствуют о наличии значительных количеств соединений белковой природы в составе эритроmasсы, на основе чего можно сделать вывод о принципиальной возможности получения полноценного гидролизата на ее основе.

Таким образом, побочный продукт производства природного интерферона – эритроmasса крови доноров характеризуется значением рН и содержанием хлоридов на физиологическом уровне, а так же высоким содержанием аминного азота, изменение концентрации которого имеет большое значение при дальнейшей переработке. Определение концентрации белка не проводилось. В негемолизированной эритроmasсе содержание основного белка – гемоглобина, заключенного в стромах эритроцитов, достоверно оценить невозможно.

3.1. Поиск оптимальных методов ферментативного гидролиза эритроmasсы крови человека

Гидролиз белкового сырья можно проводить химическим или ферментативным способом, а в некоторых случаях комбинацией указанных методов. Более перспективным считается ферментативный гидролиз, при котором исчезает необходимость нейтрализации кислот и удаления большого количества образующихся солей, а конечный продукт содержит значительно меньше гуминовых веществ. При ферментативном гидролизе животных белков наряду со свободными аминокислотами образуются пептиды, обладающие ростостимулирующей активностью [2, 78]. При всех достоинствах способ ферментативного гидролиза несовершенен. Недостатком этого метода является невысокая степень гидролиза, поэтому высокие требования предъявляются к ферментным препаратам [4, 123]. При ферментативном способе гидролиза

могут быть использованы как изолированные, так и иммобилизированные препараты ферментов. При решении вопроса о возможности иммобилизации ферментов решающую роль играет активность фермента и ее сохранение при иммобилизации, а так же стоимость фермента. Чем дороже фермент, тем выгоднее его иммобилизация для многократного использования. Протеолитические ферменты, такие как пепсин, трипсин, химотрипсин достаточно распространены по доступной цене. По этой причине иммобилизация таких ферментов не получила широкого распространения.

В разделе представлены материалы по получению ферментативных гидролизатов из отхода производства интерферона с использованием трипсина и пепсина. Варьирование способов протеолиза в зависимости от используемых ферментов сводится к индивидуальным целям исследователей. Ввиду того, что одним из приоритетных путей использования продуктов гидролиза эритромазсы являлось создание питательной среды, то при выборе фермента особое внимание уделяли содержанию аминного азота в конечных гидролизатах. Известными коммерчески доступными ферментами и широко применяющимися в гидролизных производствах являются трипсин и пепсин.

Трипсин – фермент класса гидролаз, расщепляющий пептиды и белки, при этом обладает эстеразной активностью. Оптимум каталитической активности при рН (7,9±0,1). Трипсин преимущественно расщепляет пептидные связи, образованные карбоксильными группами аргинина и лизина [56]. Трипсины относятся к группе сериновых протеаз и содержат в активном центре остатки серина и гистидина. Трипсины легко подвергаются самоперевариванию, что приводит к загрязнению продуктов трипсинового гидролиза неактивными веществами [13] и требуют высокоэффективных методов очистки.

Пепсин – эндопептидаза, поэтому в результате его действия на белки образуются пептиды средней и низкой молекулярной массы. При гидролизе белков *in vitro* с использованием пепсина можно получать мелкие пептиды и свободные аминокислоты, однако этот процесс протекает относительно медленно. Пепсиноген – неактивная форма пепсина. Пепсиноген – белок,

состоящий из одной полипептидной цепи с молекулярной массой 40 кДа. Под действием хлористоводородной кислоты он превращается в активный пепсин (молекулярная масса 32,7 кД) с оптимумом рН ($1,8 \pm 0,2$). В процессе активации в результате частичного протеолиза от N-конца молекулы пепсиногена отщепляются 42 аминокислотных остатка, которые содержат почти все положительно заряженные аминокислоты в виде смеси пептидов. Некоторые из этих пептидов могут действовать как ингибиторы пепсина. Эти пептиды содержат 12 из 16 остатков основных аминокислот, имеющих в пепсиногене; их освобождение снижает изоэлектрическую точку от рН от 3,7 для пепсиногена и до 1,0 для пепсина, поскольку в ферменте сильно доминирующими оказываются анионные группы. Карбоксильные группы двух остатков аспарагиновой кислоты входят в состав активного центра пепсина. Таким образом, в активном пепсине преобладающими оказываются отрицательно заряженные аминокислоты, которые участвуют в конформационных перестройках молекулы и формировании активного центра. Образовавшиеся под действием хлористоводородной кислоты активные молекулы пепсина быстро активируют остальные молекулы пепсиногена. Пепсин в первую очередь гидролизует пептидные связи в белках, образованные ароматическими аминокислотами (фенилаланин, триптофан, тирозин) и несколько медленнее – образованные лейцином и дикарбоновыми аминокислотами [56].

При гидролизе эритромассы исследовали действие двух концентраций каждого фермента 0,16 и 1 %, исходя из расчета расхода протеолитического агента 2,4 и 15 ед/г белка для трипсина; 0,4 и 2,5 мг/г белка для пепсина [19]. В дальнейшем значения концентраций ферментов варьировали в поиске оптимального количества протеолитических единиц для сырья сложного состава, такого, как эритромасса. На данном этапе исследований осуществляли выбор протеолитического агента и ориентировались на количество аминного азота в конечном продукте и возможность его очистки. Оптимальную концентрацию фермента определяли в дальнейшем. Для получения

ферментативных гидролизатов отхода производства ЧЛИ – эритро­массы крови применяли трипсин сухой с активностью до 1500 единиц на 1 мг белка (серии № 1 и 2), раствор трипсина 0,25 % с 1мМ ЭДТА (серия № 3), пепсин сухой с активностью 250 единиц на 1 мг белка (серии № 4 и 5).

Для серий № 1 и 2 с использованием сухого трипсина эритро­массу предварительно разбавляли физиологическим раствором и подщелачивали раствором 1,0 М гидроксида натрия до значения рН (7,9±0,1). Для получения серии №3 эритро­массу разводили раствором фермента и подщелачивали раствором 1М гидроксида натрия до рН (7,9±0,1). Для получения опытных серий пепсиновых гидролизатов № 4 и 5 эритро­массу предварительно подкисляли до значения рН (1,8±0,2) растворами 1,0 М и 0,1 М хлористоводородной кислоты. В опытной серии № 1 конечная концентрация фермента трипсина составляла 1 %, в серии № 2 – 0,16 %. При использовании раствора трипсина 0,25% была получена серия №3, конечная концентрация фермента в котором составляла 0,16%. В опытной серии №4 гидролизата конечная концентрация пепсина составляла 1 %, в серии №5 – 0,16%. Разведение эритро­массы при получении всех серий гидролизатов составляло 1:2 (разводили в 3 раза). Цельный неразбавленный субстрат не использовали ввиду высокой вязкости эритро­массы, что могло привести к неравномерному распределению фермента в среде и низкой эффективности гидролиза. Полученные растворы тщательно перемешивали до равномерного распределения фермента в объеме среды. Продолжительность гидролиза при температуре (36±1) °С составляла 48 часов в стационарных условиях. Полученные растворы для прекращения гидролиза выдерживали 10 минут на водяной бане при температуре 90 °С, после чего центрифугировали в течение 20 мин со скоростью вращения ротора 1300 об/мин.

Были получены образцы серий трипсиновых гидролизатов № 1, 2 и 3, представляющие собой по внешнему виду темно-коричневые осадки и надосадочные жидкости, различимые только по консистенции, которые в дальнейшем стягивали с помощью пипетки и повторно центрифугировали в

течение 20 мин со скоростью вращения ротора 1300 об/мин, после чего осветляли с применением каскада фильтров с разделяющей способностью от 1,2 до 0,65 мкм, затем стерилизовали через мембрану с диаметром пор 0,22 мкм. Подобные манипуляции позволяли получать прозрачную жидкость коричневого цвета. Технология получения гидролизата эритромысы с использованием как сухого трипсина, так и раствора трипсина 0,25 % характеризовалась сложностью процесса очистки на стадии разделения надосадочной жидкости и осадка, который представлял собой рыхлую субстанцию и стягивался вместе с надосадочной жидкостью. В результате эффективность дальнейшей фильтрации снижалась, увеличивался расход вспомогательных материалов, уменьшался выход готового продукта.

После центрифугирования серий пепсиновых гидролизатов № 4 и 5 образовывался плотный темно-коричневый осадок и легкоотделяемая надосадочная жидкость. Полученный гидролизат нейтрализовали до pH 7,0 растворами натрия гидроксида с концентрацией 0,1 М и 1 М, подвергали осветляющей, а затем стерилизующей фильтрации через мембрану с диаметром пор 0,22 мкм. В результате получали прозрачную жидкость желтого цвета.

Качество гидролизатов оценивали по физико-химическим параметрам, таким, как значение pH и содержание аминного азота. Необходимо отметить, что при гидролизе эритромысы как пепсином, так и трипсином количество осадка значительно превышало количество надосадочной жидкости. Это свидетельствовало о том, что в дальнейшем необходимо увеличивать либо концентрацию ферментов, либо степень разведения исходного субстрата для уменьшения количества неутрилизированных белков. Перед гидролизом разведение эритромысы в 3 раза способствовало улучшению фермент-субстратного взаимодействия ввиду того, что исходный продукт был достаточно густой по консистенции. Продолжительность гидролиза составляла 48 часов для каждой серии гидролизата. Сравнительный анализ серий гидролизатов эритромысы, полученных действием ферментов, представлен в табл. 2.

Сравнительная оценка показателей аминного азота исходного сырья и опытных серий ферментативных гидролизатов эритромассы

Показатель		№ серии гидролизата				
		1	2	3	4	5
Фермент		Трипсин сухой	Трипсин сухой	Раствор трипсина	Пепсин сухой	Пепсин сухой
С фермента, %**		1,00	0,16	0,16	1,00	0,16
рН		7,80±0,20	7,80±0,20	7,80±0,20	1,80±0,20	1,70±0,40
С ам. аз., мг%***	эритромасса	84,90±1,30	84,90±1,30	84,90±1,30	84,90±1,30	84,90±1,30
	гидролизат	123,20±3,80*	99,40±5,90	105,00±4,90	148,40±5,90*	109,20±3,80

Примечание: * – $p < 0,001$ относительно контроля (аминный азот эритромассы) по t -критерию Стьюдента; ** – концентрация фермента; *** – концентрация аминного азота.

Результаты, представленные в табл. 2, свидетельствовали о протеолитическом расщеплении эритромассы с увеличением количества аминного азота, наибольшее количество которого наблюдалось в образце № 1 (пепсин 1%) и № 4 (трипсин 1%). Графическая обработка данных представлена на рис. 2.

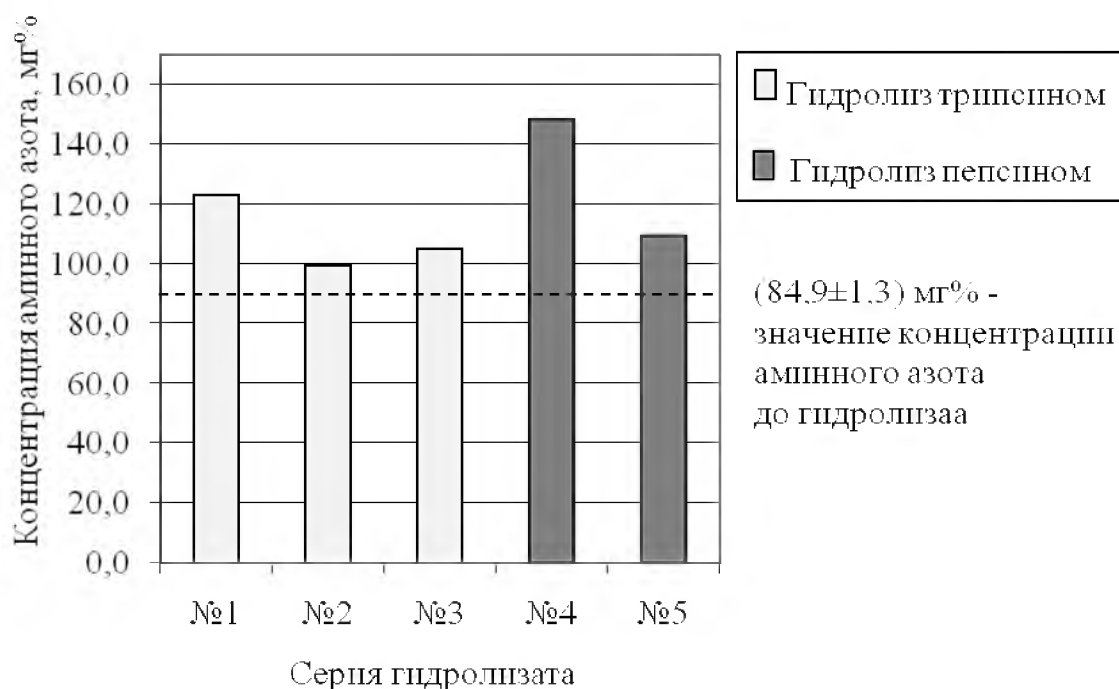


Рис. 2. Содержание аминного азота в опытных сериях гидролизата с использованием различных ферментов.

Первые результаты исследования подтвердили преимущество использования пепсина для гидролиза эритромы и с точки зрения технологии. Процесс получения гидролизата эритромы с помощью сухого пепсина характеризовался меньшими трудностями на стадии очистки по сравнению с процессом получения гидролизата с использованием трипсина. Пепсин обеспечивал более высокий выход аминного азота в конечном гидролизате, чем трипсин ($p < 0,001$).

Концентрация аминного азота в белковых гидролизатах является определяющим критерием при конструировании питательных сред. Физико-химический анализ полученных гидролизатов показал, что пепсин обеспечивает наибольшее содержание аминного азота в гидролизате. На основании приведенных данных в дальнейшем исследовании нами был использован пепсин.

Таким образом, использование препаратов трипсина (сухого или раствора) для гидролиза эритромы крови доноров позволяло получать продукт низкого качества, неудовлетворительного внешнего вида по сложной технологии с применением трудновоспроизводимых методов очистки. Немаловажным фактором при выборе фермента так же являлась его цена. В работе использовали пепсин с активностью 250 ед/мг белка («Sigma», USA) Использование сухого пепсина экономически выгоднее ввиду более низкой стоимости по сравнению с трипсином (цена в 8-10 раз ниже) [124], поэтому следующим этапом исследования стала разработка метода получения ферментативного гидролизата на основе эритромы с использованием пепсина.

Основной единицей состава эритромы является эритроцит, внутри которого сосредоточен белок гемоглобин – главная мишень гидролиза. Эритроцит в зрелом состоянии лишен ядра и органелл и имеет форму двояковогнутого диска, обуславливающую высокое отношение площади к объему, что облегчает газообмен. Особенности цитоскелета и клеточной мембраны позволяют эритроцитам претерпевать значительные деформации и

восстанавливать форму. Одним из проявлений жизненного цикла эритроцитов является их гемолиз; при этом в крови обнаруживаются "тени" (оболочки) эритроцитов [17]. Таким образом, предварительная обработка эритроцитов обеспечит выход гемоглобина во внешнюю среду, что положительно скажется на степени гидролиза, т.к. площадь контакта фермента с атакуемым белком будет значительно больше.

В качестве метода гемолиза эритроцитов применяли процедуру замораживания-дефростации. Емкость с исходным сырьем помещали в морозильную камеру с температурой минус $(50 \pm 1)^\circ\text{C}$ на 24 ч. Впоследствии емкость с замороженной эритро массой оставляли при комнатной температуре $(20 \pm 2)^\circ\text{C}$ до полного оттаивания. Для оценки качества гемолиза эритро массы использовали метод подсчета эритроцитов в счетной камере Горяева по методике, изложенной в справочнике Меньшикова (1987). В результате было выявлено, что эритро масса не содержит целых эритроцитов. Сделан вывод о целесообразности применения трехкратной процедуры замораживания-дефростации для гемолиза эритроцитов в эритро массе. Таким образом, мы добились выхода белка из стромы эритроцитов для увеличения интенсивности гидролиза в дальнейшем.

Были определены физико-химические параметры эритро массы после трехкратной процедуры замораживания-дефростации, применяемой с целью гемолиза эритроцитов. Данные представлены в табл. 3.

Таблица 3

Сравнительная оценка физико-химических показателей исходной и гемолизированной эритро массы

Показатель	Значение	
	Исходное	После гемолиза
pH	$6,81 \pm 0,23$	$6,91 \pm 0,32$
Cl, %	$0,86 \pm 0,04$	$0,86 \pm 0,04$
C ам. аз, мг ⁰ %	$254,80 \pm 3,80$	$288,40 \pm 5,90^*$

Примечание: * – $p < 0,001$ (относительно исходного значения концентрации аминного азота) по *t*-критерию Стьюдента.

По результатам, представленным в табл. 3, можно сделать вывод, что трехкратная процедура замораживания-дефростации оказывала статистически достоверное влияние на одну из физико-химических характеристик сырья – концентрацию аминного азота по сравнению с исходной. Статистически значимых различий для параметров рН и концентрации хлоридов не было.

Вслед за процедурой, вызывающей гемолиз эритроцитов и высвобождение белка гемоглобина для усиления фермент-субстратного взаимодействия применяли метод автоклавирования и метод выдерживания на водяной бане при низком значении рН. Эти процедуры важны так же с точки зрения обеспечения вирусной безопасности сырья [31, 81] и конечного продукта на его основе. Для крови и ее компонентов установлены критерии, в частности, выявление образцов, опасных в отношении гемотрансмиссивных инфекций (вирусные гепатиты, ВИЧ, сифилис и т.п.) [83]. Проводили анализ прозрачной фракции, получаемой после отстаивания образца эритромаcсы. Данная процедура позволяла оценивать содержание вирусного материала довольно условно. Для исключения возможного заражения продуктов гидролиза эритромаcсы вирусным материалом применяли два метода термообработки сырья: автоклавирование и выдерживание на водяной бане при кислом рН. Автоклавирование температуре 120 °С в течение 45 мин способствовало инаktivации гемотрансмиссивных инфекций, включая даже самый устойчивый к внешним условиям вирус гепатита В [12, 23]. Но данный метод не использовали в дальнейшей работе, поскольку в результате получали спекшийся сгусток эритромаcсы. Таким образом, автоклавирование как способ предварительной обработки сырья и снижения возможной вирусной нагрузки эритромаcсы был исключен. Так же применяли способ выдерживания на водяной бане при температуре 90 °С при кислом значении рН (1,8±0,2) [99]. Эритромаcсу смешивали с растворами 0,1М и 1,0М хлористоводородной кислоты в соотношении 1:2, образцы помещали во флакон с узким горлом для минимизации потерь объема субстрата от выпаривания влаги. Во время выдерживания эритромаcсы на водяной бане для интенсификации процесса

содержимое флаконов энергично встряхивали. Подкисление проводили ввиду того, что многие возбудители гемотрансмиссивных инфекций неустойчивы при низких значениях рН. В табл. 4 приведена оценка физико-химических свойств раствора гемолизированной эритроцитной массы после выдерживания на водяной бане.

Таблица 4

Сравнительная оценка физико-химических показателей исходной и выдержанной на водяной бане эритроцитной массы

Время, мин	Физико-химический показатель	
	рН	С ам.аз.***, мг%
0	1,6±0,2	93,8±6,3
10	1,8±0,2	98,0 ±7,0
20	1,9±0,2	95,2±6,3*
60	2,6±0,1	109,2±3,8**
120	3,4±0,2	109,2±6,3**
180	3,7±0,2	114,8±9,4

Примечание. * – $p > 0,05$; ** – $p < 0,01$ (относительно значения концентрации аминного азота при 0 мин) по t -критерию Стьюдента; ***- концентрация аминного азота

По результатам, представленным в табл. 4, можно сделать вывод, что после выдерживания на водяной бане при кислотном значении рН раствора гемолизированной эритроцитной массы отмечается статистически достоверное увеличение содержания аминного азота по сравнению с исходным значением на 60 мин. Значение рН-фактора на протяжении 3-х часов исследований имело тенденцию расти. Значительное нежелательное повышение значения рН после 60 мин выдерживания явилось основным параметром при определении оптимальной продолжительности процесса. Следовательно, температурную обработку подкисленного раствора эритроцитной массы при температуре 90 °С целесообразно вести не более 1 ч. На рис. 3 представлено графическое описание изменения концентрации аминного азота в зависимости от продолжительности выдерживания кислого раствора эритроцитной массы на водяной бане.

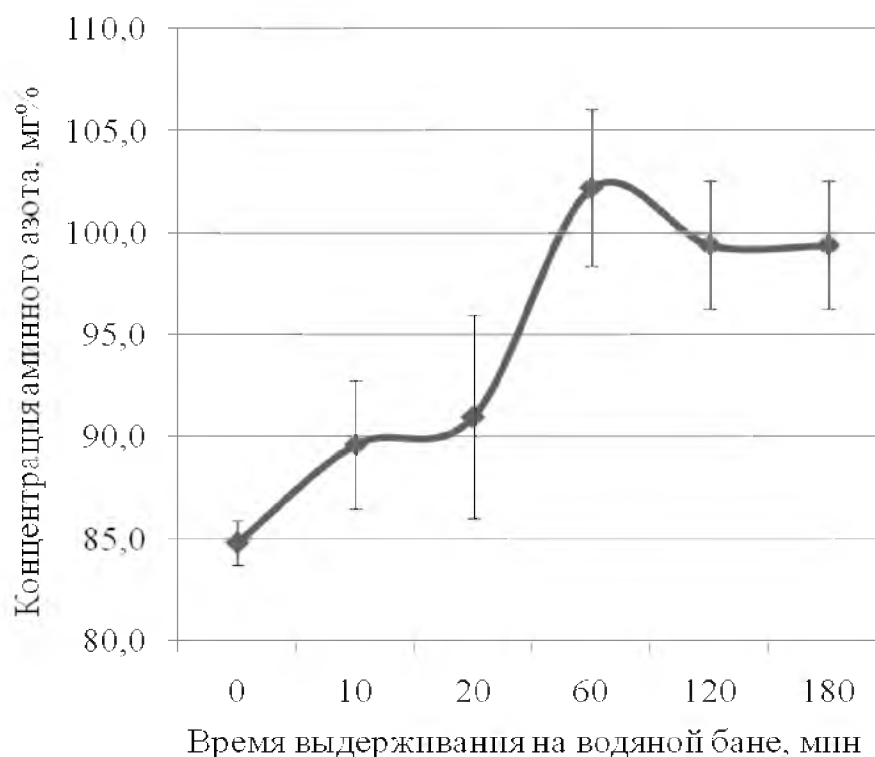


Рис. 3 Зависимость концентрации аминного азота от времени выдерживания подкисленной эритромысы на водяной бане

По данным рис. 3 можно сказать, что значение концентрации аминного азота имеет статистически достоверное различие только на 60 мин. Таким образом, относительно исходной эритромысы применяли метод гемоллиза с последующей высокотемпературной обработкой, во-первых, для интенсификации гидролиза за счет увеличения площади фермент-субстратного взаимодействия, во-вторых, для дополнительной обработки сырья с целью вирусинактивации. Поэтому обработка сырья перед гидролизом обеспечивала не только эффективность расщепления, но и безопасность конечного продукта. Подготовка к процессу гидролиза – наиболее важный этап исследований. После проведенного анализа литературы было выявлено, что знание исходного состава гидролизуемого сырья и его свойств – наиболее простой путь для достижения конкретных целей, в частности, степени, продолжительности гидролиза, и других параметров, относящихся к самому процессу [54, 110]. После предварительной обработки эритромысы – гемоллиза и выдерживания на водяной бане получали субстрат коричневого цвета. Объем субстрата доводили

растворами 0,1 М и 1,0 М хлористоводородной кислоты до достижения рН активации фермента пепсина ($1,8\pm 0,2$). В итоге исходный раствор эритро­массы разбавляли в 4,5 раза. Дополнительное разведение требовалось ввиду того, что после выдерживания на водяной бане рН возрастало до значения ($2,6\pm 0,1$), а использование концентрированной хлористоводородной кислоты было исключено, так же учтены особенности фермент-субстратного взаимодействия при гидролизе [100]. Данные физико-химического анализа рабочего раствора эритро­массы представлены в табл. 5.

Таблица 5

Физико-химическая характеристика рабочего раствора эритро­массы, предназначенного для гидролиза

Показатель	Значение
рН	$1,80\pm 0,20$
Cl, %	$0,35\pm 0,05$
С ам.аз., мг %	$70,00\pm 4,90$

На следующем этапе исследований рабочий раствор эритро­массы разливали по 50 мл в пять колб (объем колбы 100 мл), содержащих навески ферментов в количестве 2; 4; 6; 8; 10 г по отношению к объему исходного субстрата (рис. 4). Концентрацию пепсина подбирали опытным путем, исходя из того, что концентрация 1%, соответствующая протеолитической активности 2,5 ед/г белка, была не достаточной для высокой степени расщепления гемоглобина. Растворы эритро­массы и фермента тщательно перемешивали и доводили рН растворов до значения ($1,8\pm 0,2$), добавляя по каплям раствор 1 М хлористоводородной кислоты. После процедуры подкисления в каждую колбу добавляли рабочий раствор эритро­массы до метки. Таким образом, были получены растворы фермент-субстратной смеси эритро­массы с рН ($1,8\pm 0,2$) и конечной концентрацией фермента 2; 4; 6; 8; 10% по отношению к объему исходного субстрата – эритро­массы (рис. 4).

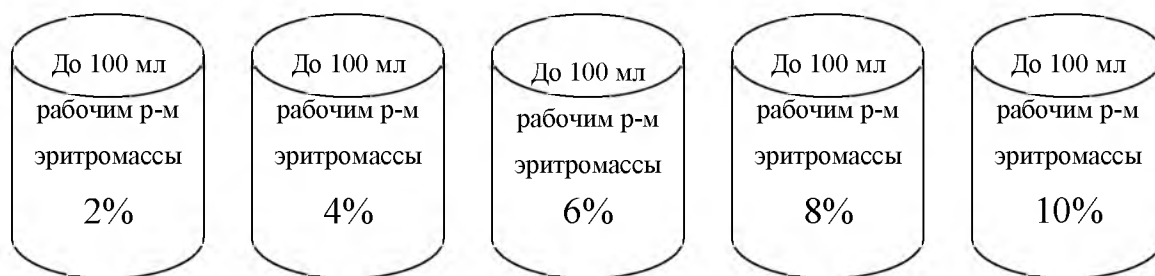


Рис. 4 Схема приготовления растворов фермент-субстратной смеси

Полученные смеси разливали в пенициллиновые флаконы в объеме (18 ± 2) мл (по 4 пенициллиновых флакона для каждой концентрации фермента). На следующем этапе работы были определены основные физико-химические характеристики ферментативных гидролизатов эритрономассы в зависимости от продолжительности гидролиза и концентрации фермента. Данные представлены в табл. 6.

Таблица 6

Физико-химическая характеристика ферментативных гидролизатов эритрономассы

		Физико-химическ	Продолжительность гидролиза, ч			
			24	72	144	168
Концентрация фермента, %	2	pH	$3,6 \pm 0,1$	$3,6 \pm 0,1$	$3,5 \pm 0,1$	$3,6 \pm 0,1$
		С ам.аз.,	$121,8 \pm 3,8$	$133,0 \pm 4,9^{**}$	$165,2 \pm 3,8^*$	$163,8 \pm 3,8$
	4	pH	$3,7 \pm 0,1$	$3,8 \pm 0,1$	$3,7 \pm 0,1$	$3,7 \pm 0,1$
		С ам.аз.,	$191,8 \pm 6,3$	$177,8 \pm 3,8^{***}$	$204,3 \pm 3,2^*$	$208,6 \pm 3,1$
	6	pH	$3,8 \pm 0,1$	$3,8 \pm 0,1$	$3,8 \pm 0,1$	$3,8 \pm 0,1$
		С ам.аз.,	$250,6 \pm 5,9$	$268,8 \pm 3,8^{**}$	$291,2 \pm 3,8^*$	$292,6 \pm 5,9$
	8	pH	$3,9 \pm 0,1$	$4,0 \pm 0,1$	$4,0 \pm 0,1$	$3,9 \pm 0,1$
		С ам.аз.,	$326,2 \pm 6,3$	$319,2 \pm 3,8$	$347,2 \pm 3,8^*$	$352,8 \pm 3,8$
	10	pH	$4,0 \pm 0,1$	$4,1 \pm 0,1$	$4,0 \pm 0,1$	$4,0 \pm 0,1$
		С ам.аз.,	$415,8 \pm 3,8$	$427,0 \pm 4,9^{***}$	$459,2 \pm 3,8^*$	$459,2 \pm 6,3$

Примечание. * – $p < 0,001$; ** – $p < 0,01$, *** – $p < 0,05$ (относительно значения концентрации аминного азота после 24 ч гидролиза) по t -критерию Стьюдента.

Через 24, 72, 144, 168 ч гидролиза pH каждого образца с гидролизуемой смесью доводили до значения $(1,8 \pm 0,2)$, поскольку значения pH через указанные промежутки времени достигало высокого уровня $(3,60 \pm 0,10)$ и не

соответствовало значению активации фермента. Достижение уровня рН ($1,8 \pm 0,2$) производилось путем добавления раствора хлористоводородной кислоты 0,1 М и 1 М, т.е. дополнительного разведения субстрата. Исходная концентрация аминного азота в рабочем растворе эритромаcсы без добавления фермента ($70,0 \pm 4,90$). По результатам, представленным в табл. 6, можно сделать вывод о том, что статистически достоверные различия количества аминного азота наблюдались на 144 ч при любой концентрации фермента. Так же можно сказать, что увеличение содержания аминного азота происходит одновременно с увеличением концентрации фермента независимо от времени. В связи с этим далее представлена таблица с данными контрольного опыта, по результатам которого было выявлено, какое количество аминного азота приходится на долю самого фермента. На основании представленных выше данных сложно сделать вывод об оптимальной концентрации фермента. Поэтому за одну из характеристик гидролизатов приняли их внешний вид, прозрачность, а так же плотность осадка после центрифугирования.

Достаточно плотные по консистенции осадки получены для образцов с концентрацией ферментов 4 %, 6 % и 8 %, при этом самая светлая надосадочная жидкость наблюдалась в образцах с концентрацией фермента 6 %, 8 % и 10 %. Несмотря на самую светлую надосадочную жидкость, полученную после центрифугирования образца гидролизата при концентрации фермента 10 %, осадок обладал неплотной консистенцией. При попытке стягивания надосадочной жидкости легко взмучивался, усложняя процесс очистки. Для определения минимальной рабочей концентрации фермента исследования были продолжены.

Провели контрольный опыт – псевдогидролиз пепсина (в отсутствии субстрата). Условия псевдогидролиза соответствовали условиям гидролиза эритромаcсы. Осуществление данного опыта считали целесообразным ввиду того, что пепсин как самостоятельная белковая структура при рН активации способна выделять аминный азот в среду даже при отсутствии субстрата. Соответственно, в гидролизате фермент-субстратной смеси присутствовал

аминный азот как эритромы, так и самого фермента пепсина. При этом для растворения и активации пепсина в образцах контрольного опыта была взята хлористоводородная кислота той же концентрации, что и для образцов гидролизатов. Полученные данные представлены в табл. 7.

Таблица 7

Физико-химическая характеристика образцов контрольного опыта

		Физико-химический показатель	Продолжительность гидролиза, ч			
			24	72	144	168
Концентрация фермента, %	2	pH	2,9±0,1	2,9±0,1	3,0±0,1	3,1±0,1
		C ам.аз., %	43,4±3,1	51,8±3,8*	56,0±4,9**	60,2±3,8***
	4	pH	2,9±0,1	2,9±0,1	3,0±0,1	3,2±0,1
		C ам.аз., %	67,2±3,8	86,8±3,8**	117,6±3,1***	116,2±3,8
	6	pH	3,0±0,1	3,2±0,1	3,1±0,1	3,2±0,1
		C ам.аз., %	75,6±3,1	109,2±3,8**	152,6±3,1***	160,2±3,8
	8	pH	3,3±0,1	3,4±0,1	3,4±0,1	3,4±0,1
		C ам.аз., %	96,6±5,9	176,8±6,3**	218,4±5,9***	224,0±7,0
	10	pH	3,5±0,1	3,4±0,1	3,6±0,1	3,7±0,1
		C ам.аз., %	144,2±3,8	187,6±3,1**	263,2±6,3***	261,8±3,8

Примечание. * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$, *** – $p < 0,001$ (относительно значения концентрации аминного азота после 24 ч гидролиза), по t -критерию Стьюдента.

По данным табл. 3 можно сделать вывод о том, что при псевдогидролизе раствора пепсина без белкового субстрата происходит собственное расщепление молекулы фермента на аминокислоты, при этом содержание аминного азота в контрольных образцах, так же, как и в экспериментальных, зависит от концентрации фермента и продолжительности процесса.

Поскольку аминный азот – это азот, входящий в состав аминокислот, содержащихся в субстрате [98], а также показатель расщепления пептидных связей, то целесообразно было провести математическое моделирование для вычисления количества аминного азота, приходящегося непосредственно на эритрому. Для вычисления в образцах гидролизатов количества аминного азота, выделенного собственно эритрому, с учетом доли аминного азота,

приходящейся на фермент, проводили математическое моделирование. Расчет аминного азота собственно эритромысы производили по формуле:

$$C \text{ ам. аз/эр} = C \text{ ам. аз/см} - C \text{ ам. аз/к. пр.}, \text{ где}$$

$C \text{ ам. аз/эр}$ – концентрация аминного азота собственно эритромысы в гидролизованной смеси; $C \text{ ам. аз/см}$ – общая концентрация аминного азота в гидролизованной смеси (эритромыса и фермент); $C \text{ ам. аз/к. пр.}$ – концентрация аминного азота в контрольной пробе (без внесения эритромысы).

Данные математических расчетов были приведены к виду ($M \pm m$) путем статистической обработки (табл. 8).

Таблица 8

Данные математического расчета содержания аминного азота в гидролизате эритромысе

		С ам.аз., %	Продолжительность гидролиза, ч			
			24	72	144	168
Концентрация фермента, %	2	Смесь	121,80±3,80	133,00±4,90	165,20±3,80	163,80±3,80
		Контроль	43,40±3,10	51,80±3,80	56,00±4,90	60,20±3,80
		Гидролизат	78,40±0,70	81,20±1,10	109,20±1,10*	103,60±0,00**
	4	Смесь	191,80±6,30	177,80±3,80	204,30±3,20	208,60±3,10
		Контроль	67,20±3,80	86,80±3,80	117,60±3,10	116,20±3,80
		Гидролизат	124,60±2,40	91,00±0,00	86,70±0,10*	92,40±0,70
	6	Смесь	250,60±5,90	268,80±3,80	291,20±3,80	292,60±5,90
		Контроль	75,60±3,10	109,20±3,80	152,60±3,10	160,20±3,80
		Гидролизат	175,00±2,70	159,60±0,00	138,60±0,70*	132,40±4,10
	8	Смесь	326,20±6,30	319,20±3,80	347,20±3,80	352,80±3,80
		Контроль	96,60±5,90	176,80±6,30	218,40±5,90	224,00±7,00
		Гидролизат	229,60±0,40	142,40±2,50	128,80±2,00*	128,80±3,20
10	Смесь	415,80±3,80	427,00±4,90	459,20±3,80	459,20±6,30	
	Контроль	144,20±3,80	187,60±3,10	263,20±6,30	261,80±3,80	
	Гидролизат	271,60±0,00	239,40±1,80	196,00±2,40*	197,40±2,40	

Примечание: * – $p < 0,001$ по сравнению со значением концентрации аминного азота через 24 ч гидролиза; ** – $p > 0,05$ по сравнению со значением концентрации аминного азота после 144 ч гидролиза, по t -критерию Стьюдента.

По результатам расчета, представленным в табл. 8, замечено, что при любой концентрации фермента на 144 ч гидролиза значение концентрации аминного азота достоверно изменяется по сравнению с соответствующим значением после 24 ч гидролиза, но при концентрации фермента 2 % оно увеличивается, при других концентрациях фермента – уменьшается (рис. 5). Зависимость количества аминного азота, выделяемого собственно эритро массой от продолжительности гидролиза и концентрации протеолитического фермента, прослеживается графически (рис. 5).

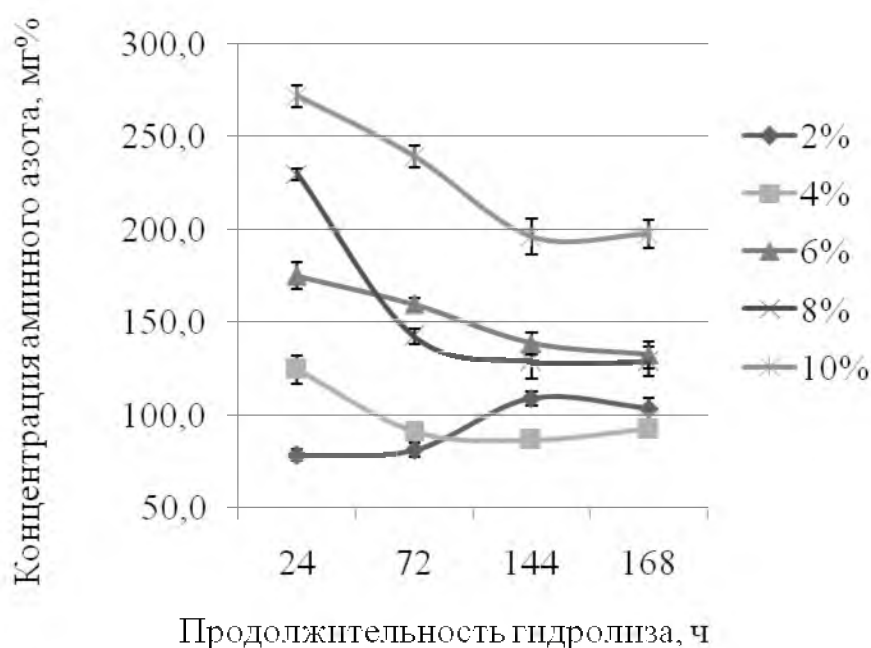


Рис. 5 Зависимость количества аминного азота, выделяемого собственно эритро массой, от продолжительности гидролиза и концентрации фермента

Увеличение концентрации аминного азота с течением времени прослеживалось при концентрации пепсина 2 %. При более высоких концентрациях фермента прослеживался спад выхода аминного азота. При концентрации фермента от 4 % и выше значения содержания аминного азота существенно превышали допустимые концентрации в стандартных питательных средах уже через 24 ч гидролиза. Стандартные питательные среды характеризуются содержанием аминного азота около 110 мг % [79]. При гидролизе эритро массы мы преследовали так же целью вирусинактивацию потенциально опасного сырья за счет длительного выдерживания при низком

значении рН, подобно процессу вирусинактивации полуфабриката интерферона (выдерживание при рН $(2,2 \pm 0,2)$ в течение не менее 120 ч). Стадия гидролиза была приравняна ко второй ступени вирусинактивации [24]. По этой причине ориентировались на более продолжительное время гидролиза. Ввиду того, что от количества вносимого фермента напрямую зависела себестоимость конечного гидролизата, ориентировались на его наименьшую концентрацию. Для исключения перерасхода фермента в дальнейшей работе использовали концентрацию фермента 2%. При продолжительности гидролиза 168 ч и концентрации фермента 2% не существовало статистически значимых различий значений концентрации аминного азота по сравнению с величиной, соответствующей 144 ч. Оптимальным временем проведения гидролиза при данной концентрации являлось 144 ч (рис. 5).

Таким образом, после проведения эмпирических расчетов было выявлено, что увеличение концентрации аминного азота собственно эритромысы наблюдалось только в случае использования пепсина в количестве 2% от объема гидролизуемой смеси до 144 ч гидролиза. После такой продолжительности гидролиза концентрация аминного азота собственно эритромысы падала. Соответственно, было принято, что оптимальным временем гидролиза эритромысы можно считать 144 ч при концентрации фермента пепсина 2%. Как уже было сказано, при оптимальных условиях и продолжительности гидролиза, получали мутный гидролизат, темно-коричневого цвета. Дальнейшие исследования были посвящены улучшению внешнего вида полученного гидролизата.

Оценивали возможность применения метода перекисного осветления гидролизата эритромысы, освоенного при переработке крови крупного рогатого скота для получения пищевых добавок. Сущность оригинального метода состояла в том, что в осветляемую смесь добавляли раствор перекиси водорода (33 %) в количестве 5,33% от объема гидролизованной смеси, выдерживали 15 мин при температуре 66 °С, затем нейтрализовали остатки непрореагировавшей перекиси водорода с помощью фермента каталазы, от

которой в дальнейшем осветленную смесь очищали [40]. Ввиду нежелательности введения дополнительных ферментных препаратов в наш гидролизат было проведено исследование, посвященное поиску наименьшей концентрации перекиси водорода, при которой наблюдалось удовлетворительное просветление гидролизата эритромысы. Данные опыта приведены в табл. 9.

Таблица 9

Зависимость интенсивности осветления гидролизата от исходной концентрации перекиси водорода

Концентрация перекиси водорода, %	Интенсивность осветления
33	+++
20	++
15	++
10	+ -
5	-
3	-
1	-

Примечание: «+++» – наилучший эффект просветления;
«-» – нет эффекта просветления.

Получен образец, осветленный с использованием 15 % H_2O_2 по описанной выше методике, введенной в количестве 5,33 % от объема гидролизата. Образец центрифугировали при (1500 ± 200) об/мин в течение 10 мин. Проведена оценка содержания непрореагировавшей перекиси водорода в гидролизате после центрифугирования. Остаточная концентрация перекиси водорода составила 0,016 %. Таким образом, введение в гидролизат перекиси водорода с конечной концентрацией 0,8 % дало эффективное осветление гемсодержащих веществ гидролизата и не требовало инактивации избытка H_2O_2 .

Был разработан метод получения ферментативного гидролизата эритромысы, определены оптимальные параметры процесса гидролиза (табл.

10), осуществлены соответствующие расчеты, подтверждающие эффективность использования соответствующих значений параметров гидролиза.

Таблица 10

Оптимальные параметры процесса гидролиза эритромы

Параметр	Значение
Протеолитический агент	пепсин сухой (250 у.е. на 1 мг белка)
Концентрация фермента	2% от исходного объема сырья
pH	1,8±0,2
Продолжительность гидролиза	144 ч
Температура	(37±1) °C

По результатам эксперимента (табл. 10) был сделан вывод о том, что процедуру гидролиза эритромы необходимо осуществлять в течение 144 ч при концентрации фермента 2 %, при значении pH (1,8±0,2) и температуре (37±1) °C.

В результате ферментативного гидролиза и перекисного осветления было получено производное человеческой крови, новая субстанция – депротеинизированный гемодериват эритромы крови человека, представляющий собой прозрачный, без механических включений, раствор светло-желтого цвета. После гидролиза эритромы получали раствор со значением pH от 1,6 до 2,0. Для исключения протекания дальнейшего расщепления и удобства хранения использовали высушивание. Стабилизацию раствора при высоких температурах не применяли ввиду возможной деструкции конечных продуктов гидролиза. Для стабилизации раствора гемодеривата эритромы крови человека был выбран способ лиофильной сушки, являющийся максимально щадящим по отношению к низкомолекулярным биологически активным веществам [86].

Преимущества такого способа высушивания – отсутствие воздействия высоких температур на препарат, сохранение дисперсной фазы препарата, возможность использования летучих растворителей. Метод лиофилизации используют при получении сухих тканей, препаратов, продуктов и т. п. без

потери их структурной целостности и биологической активности. Лиофилизированные препараты при увлажнении восстанавливают свои первоначальные свойства. Консервирование биопрепаратов путем лиофильного высушивания имеет ряд преимуществ перед другими методами:

- снижается масса биопрепарата;
- длительное время сохраняется исходная активность;
- прекращается рост микробных контаминантов [34].

Таким образом, для удобства хранения и для дальнейших исследований стерильный препарат гемодеривата эритромаcсы крови человека, представленного ферментативным гидролизатом, был лиофильно высушен и упакован в стеклянные флаконы.

3.2. Характеристика физико-химических свойств гемодеривата

Была разработана технология оптимального гидролиза эритромаcсы, включающая в себя обоснование выбора протеолитического агента, его концентрации, а так же продолжительности и физико-химических условий гидролиза. Ввиду особенности исходного сырья, а именно цветности эритромаcсы, которая присутствовала и в конечном продукте – гидролизате, был найден способ осветления с последующим отделением осадка методом центрифугирования. Так же для стабилизации гемодеривата применен метод лиофильного высушивания.

Схематически технологию получения гемодеривата эритромаcсы крови человека можно представить следующим образом (рис. 6). Как при осуществлении любого биотехнологического процесса, на рис. 6 представлена разработанная технология гемодеривата эритромаcсы крови человека, которая требовала включения трех условных стадий: подготовительной, биотехнологической (ферментативный гидролиз) и постбиотехнологической, которая заключалась в очистке, стабилизации и контроля качества конечного продукта.

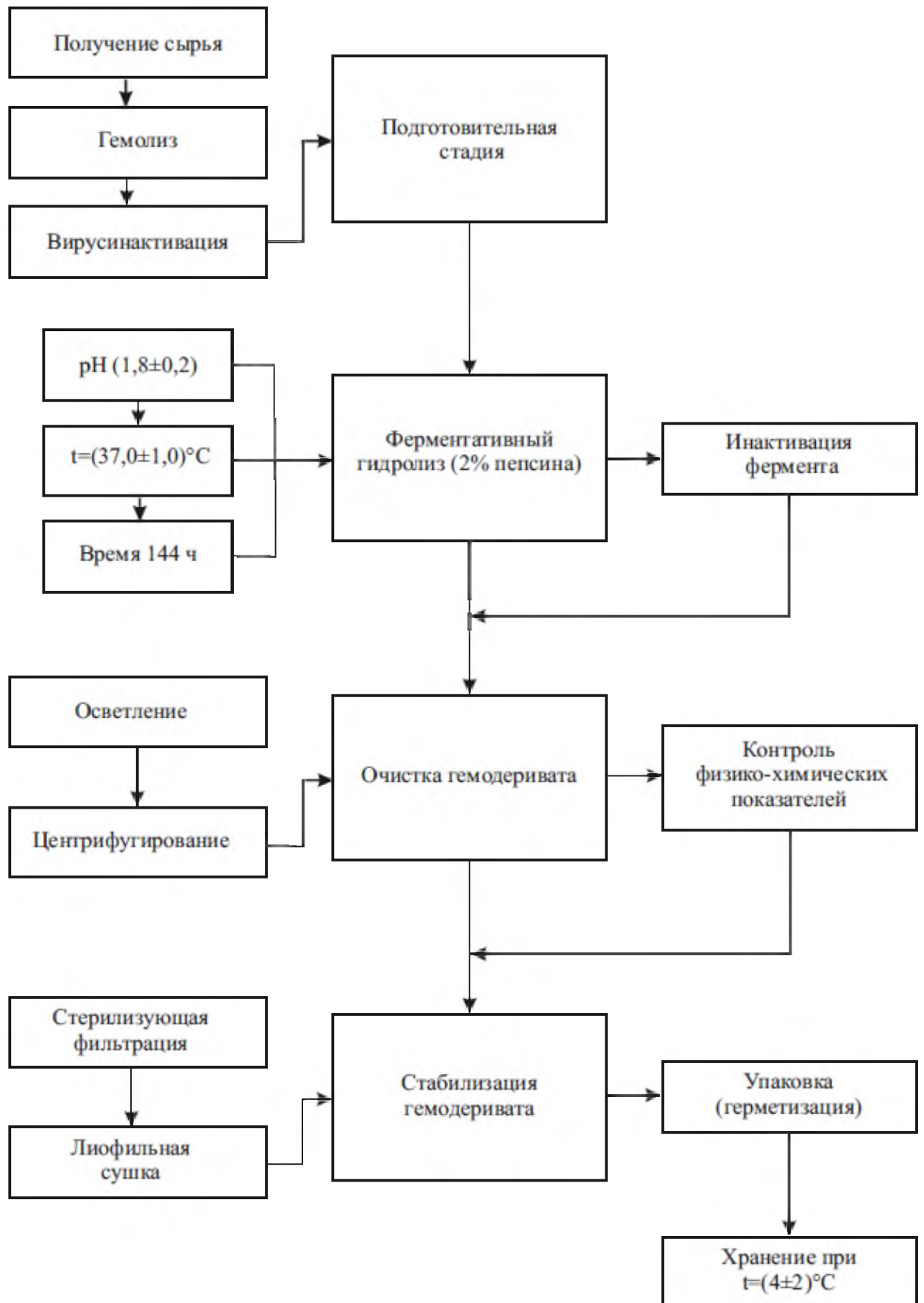


Рис. 6 Технологическая схема получения гемодеривата

В технологическую схему производства гемодеривата эритроцитной массы крови человека была введена операция контроля физико-химических показателей, значения которых определяли воспроизводимость технологии. Далее представлен материал, касающийся оценки физико-химических параметров гемодеривата, выделенного из разных серий эритроцитной массы крови человека.

Разработанная технология получения гидролизата эритроцитной массы была воспроизведена 5 раз в разные промежутки времени в течение 7 месяцев. Было выявлено, что данная технология позволяет получать гидролизат эритроцитной массы удовлетворительного внешнего вида: прозрачная, соломенно-желтого цвета жидкость без опалесценции, с характерным запахом, и в сухом состоянии – растворимая в воде и этаноле гидрофильная пористая масса светло-желтого цвета с характерным запахом.

Оценку физико-химических свойств раствора гемодеривата проводили по основным параметрам, предъявляемым к качеству питательных сред и их компонентам: показатель рН, концентрация аминного азота, содержание хлоридов. Поскольку гидролиз проводили с использованием фермента, то в конечном продукте определяли его активность, после лиофильного высушивания определяли массу сухого остатка. Так как гидролиз эритроцитной массы проводили с использованием одного фермента пепсина, то в конечном продукте контролировали содержание белковых веществ в качественной реакции с трихлоруксусной кислотой.

Для исследований использовали водный раствор гемодеривата с концентрацией сухих веществ 40 мг/мл. Гемодериват охарактеризовали как депротенинизированный раствор, поскольку он не содержал высокомолекулярных белковых частиц (доказано в реакции с трихлоруксусной кислотой). Предложенная технология позволяла получать освобожденный от протеолитического агента пепсина раствор гемодеривата. Далее перечислены физико-химические параметры гемодеривата – критерии для определения воспроизводимости технологии (табл. 11).

Физико-химическая характеристика гемодеривата
эритромаcсы крови человека

№	Показатель	Значение
1	pH	3,50±0,20
2	С ам. аз., мг%	165,20±3,80
3	Хлориды, %	0,33±0,02
4	Активность пепсина, у.е.	Отс.
5	Реакция с ТХУ	Отриц.
6	Масса сухого остатка, мг/мл	40,00±3,75

Во всех случаях значения физико-химических показателей лежали в интервалах, указанных в табл. 11. Значения параметров явились допустимыми при последующем получении гемодеривата эритромаcсы крови человека.

Дальнейшим этапом исследований явилась оценка молекулярных показателей депротенинизованного гемодеривата эритромаcсы крови человека. Была разработана воспроизводимая технология депротенинизованного гемодеривата эритромаcсы крови человека и дана оценка основных физико-химических свойств (табл. 11). Наряду с вышеуказанными параметрами были определены молекулярные параметры соединений, входящих в состав гемодеривата методом ВЭЖХ при длине волны 280 нм [84] с использованием хроматографических колонок фирмы Knauer с сорбентом Диасфер-110-Диол. Результат представлен на рис. 7. На хроматограмме видны три основных пика выхода веществ на 42,1; 47,3; 50,3 мин. Исходя из данных, представленных на хроматограмме, произведен расчет необходимых коэффициентов для вычисления молекулярной массы идентифицированных веществ и их концентрации в пробе гидролизата с использованием уравнения калибровочной прямой, полученной с помощью метчиков с известной молекулярной массой.

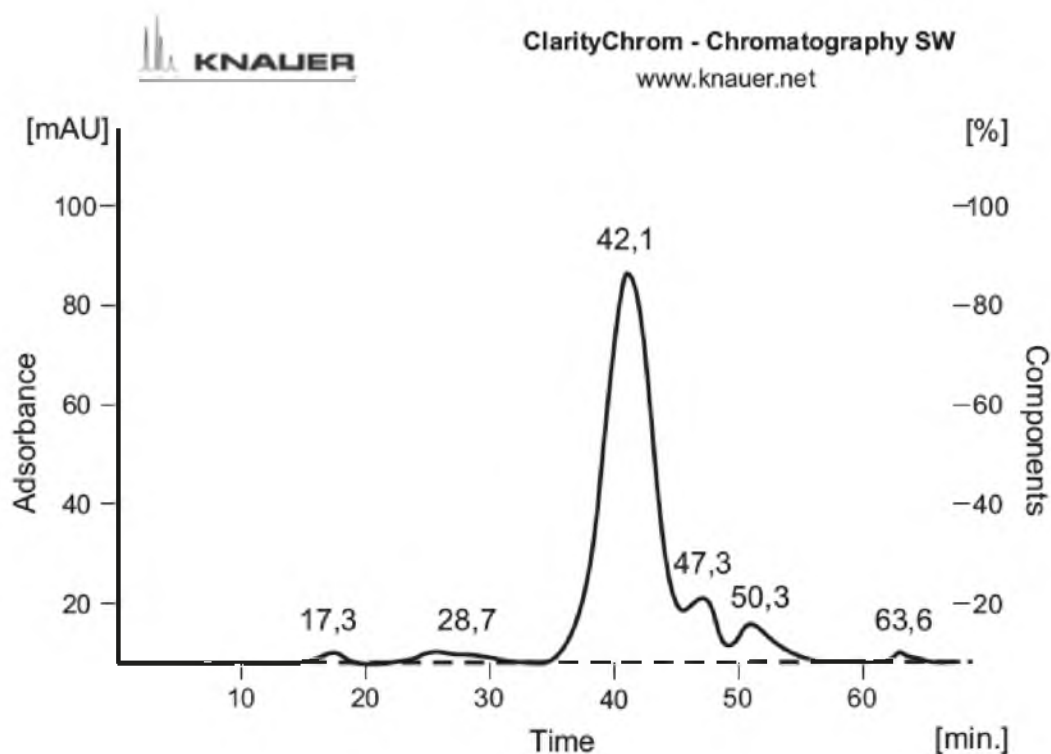


Рис. 7 Хроматограмма гемодеривата

Данные пика №1 не учитывали при расчете молекулярной массы веществ, т.к. время его выхода на хроматограмме меньше, чем время выхода первого метчика. Расчет молекулярной массы входящих в состав гемодеривата веществ приведен в табл. 12.

Таблица 12

Расчетные данные хроматограммы гемодеривата

№		Время пика, мин	Kav	Log ₁₀ Mr	Mr, Da	с*10 ⁻³ , %	с, мг/мл
пик	группа						
2	1	28,7	0,313	5,06	115986	0,88	0,04
3	2	42,1	0,687	3,78	6069	328,48	16,42
4	3	47,3	0,832	3,29	1934	24,05	1,20
5	4	50,3	0,915	3,00	1005	14,10	0,71
6	5	63,6	1,295	1,70	50	0,56	0,03

Примечание: Kav – коэффициент доступности пептидов; Mr – молекулярная масса; с – концентрация пептидов.

При анализе данных, представленных в табл. 12, был сделан вывод о том, что состав гемодеривата представлен 5-ю группами веществ различной молекулярной массы. Вещества 2-й, 3-й и 4-й группы с молекулярной массой от 1000 до 6000 Да имеют наибольшую концентрацию в растворе гидролизата, причем преобладают вещества 2-й группы ($M_r=6000$ Да, $c=16,42$ мг/мл). Веществ 3-й группы с молекулярной массой 2000 Да примерно в 13,5 раз меньше, чем веществ 2-й группы ($c=1,20$ мг/мл). Веществ 4-й группы с молекулярной массой около 1000 Да в 23 раза меньше, чем в 2-й и в 2 раза меньше, чем в 3-й группе. Концентрация веществ 1-й и 5-й группы наименьшая в гидролизате. Вещество 1-й группы с молекулярной массой 116000 Да, возможно, представляет собой метилцеллюлозу, которая используется в технологии интерферона при начальной обработке лейкоэритромассы. Вещества последней группы с молекулярной массой 50 Да, предположительно, являются аминокислотами с четырьмя атомами С (аспарагиновая кислота, треонин). Далее представлена диаграмма (рис. 8), на которой показана концентрация и молекулярная масса веществ, входящих в состав гемодеривата.

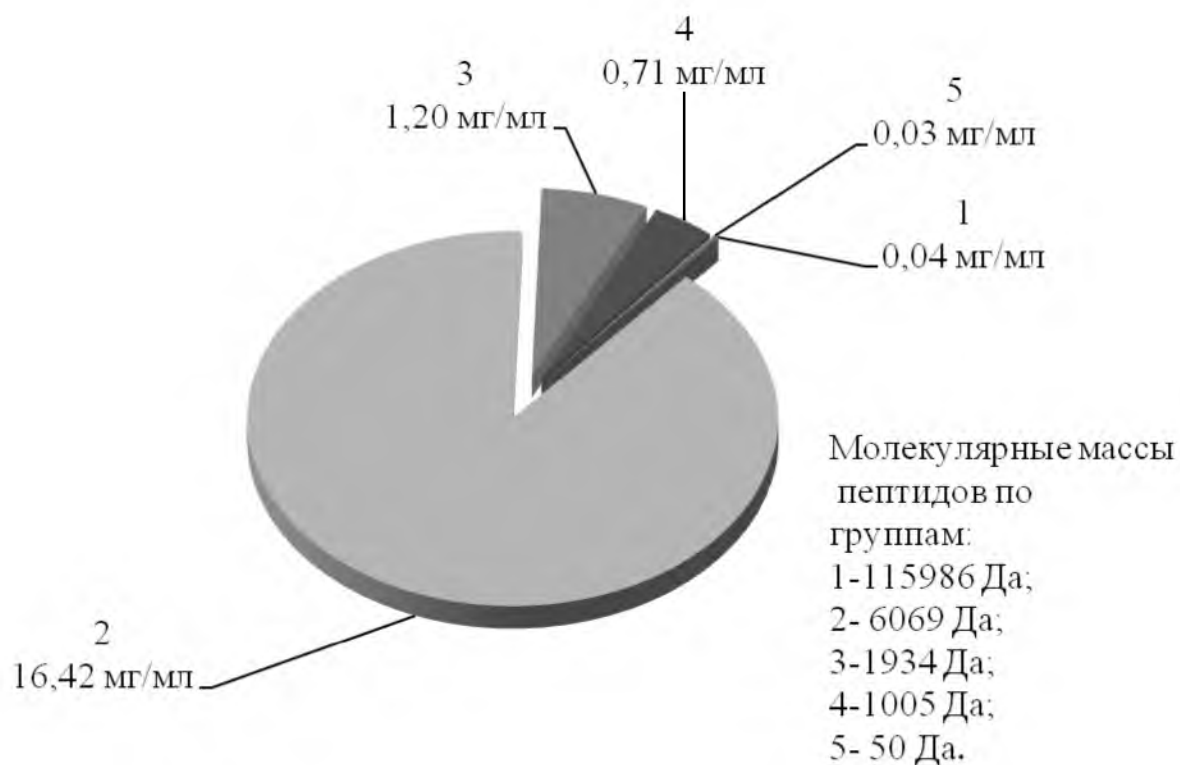


Рис. 8 Молекулярная масса и концентрация веществ, идентифицированных в составе гемодеривата

Таким образом, субстанцию гидролизованной эритромаксы можно назвать белково-углеводной. Для того, чтобы качественно оценить присутствие в гидролизате метилцеллюлозы были приготовлены растворы, содержащие 1% метилцеллюлозы: в первом в качестве растворителя использован физиологический раствор, во втором – 0,0001М раствор хлористоводородной кислоты (рН 4,1). Растворы были выдержаны в условиях термостата при температуре (37 ± 1) °С в течение 144 ч. Процедуру ВЭЖХ проводили с использованием оборудования и в условиях, аналогичных процедуре хроматографирования раствора гемодеривата. На рис. 9 представлена хроматограмма раствора метилцеллюлозы в физиологическом растворе.

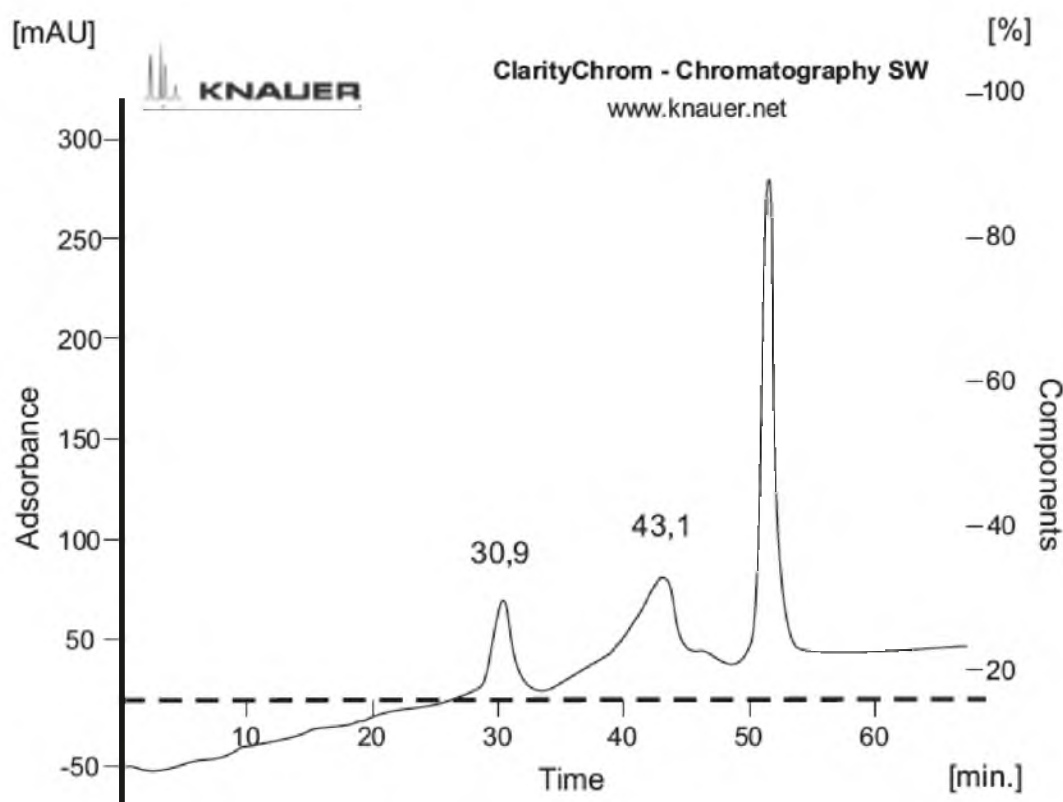


Рис. 9 Хроматограмма раствора метилцеллюлозы 1% в физрастворе

При анализе данных, полученных в результате хроматографирования метилцеллюлозы в физиологическом растворе, были выявлены 4 характерных пика, 2 из которых ярковыраженные. Были вычислены значения молекулярных масс, соответствующих пикам на хроматограмме. Результаты занесены в табл. 13.

Аналогичные операции провели с раствором метилцеллюлозы в хлористоводородной кислоте. Данные представлены на рис. 10.

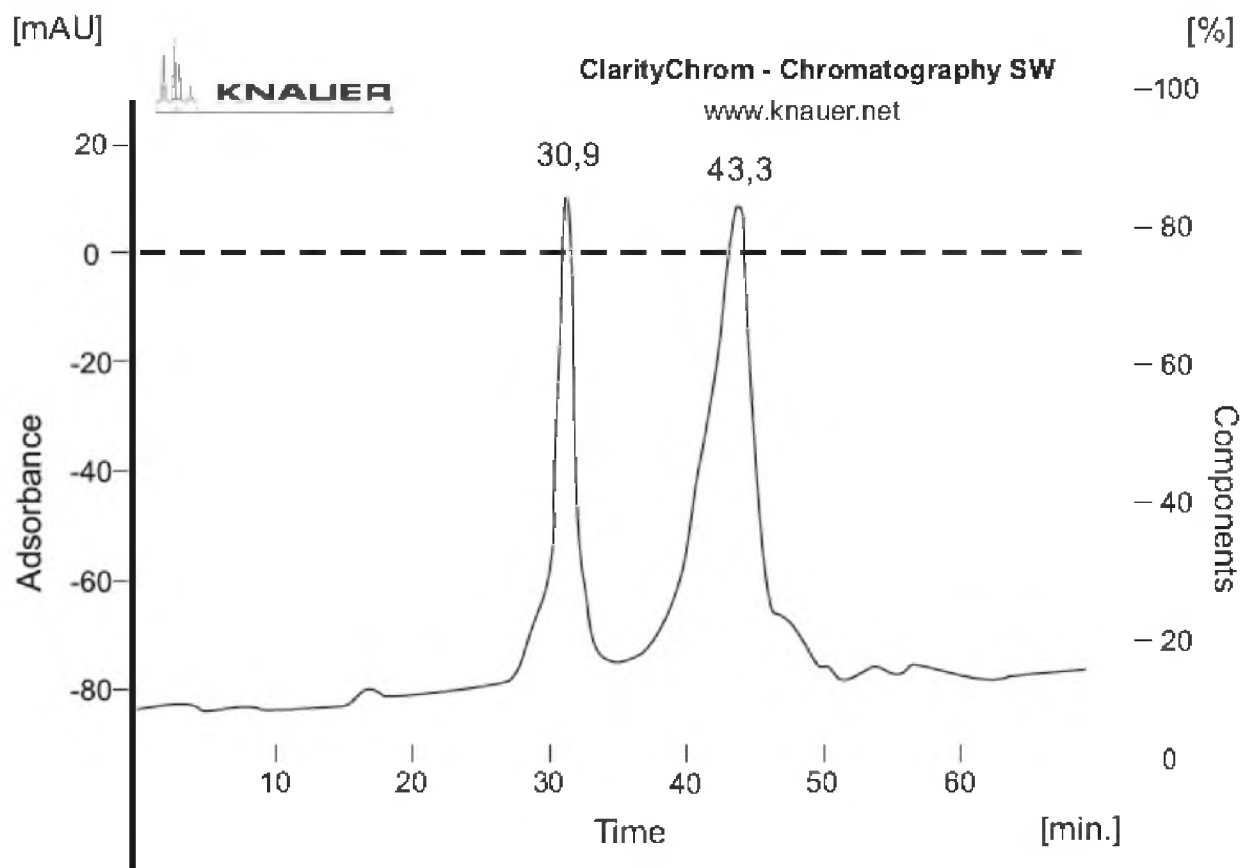


Рис. 10 Хроматограмма раствора 1% метилцеллюлозы в растворе 0,0001М хлористоводородной кислоты

По данным хроматограмм, изображенных на рис. 9 и 10, можно сделать вывод, что в обоих случаях выходит пик на 30,9 мин независимо от pH. Это вещество – метилцеллюлоза. Таким образом, можно сделать вывод, что пик на 43,1 мин на рис. 9 и пики на 43,3 мин; 45,2 мин; 47,5 мин на рис. 10 соответствуют остаткам метилцеллюлозы, поскольку происходит частичный гидролиз молекулы. Далее был произведен расчет молекулярной массы веществ, содержащихся в растворах метилцеллюлозы и идентифицированных с использованием ВЭЖХ (табл. 13).

Расчетные данные анализа хроматограмм раствора метилцеллюлозы

Раствор метилцеллюлозы	Номер пика	Время пика	Kav	IgMr	Mr, Da
в 0,9% хлорида натрия	2	30,9	0,37	4,86	71712
	3	43,1	0,71	3,69	4889
в 0,0001М растворе хлористоводородной кислоты	2	30,9	0,37	4,86	71712
	3	43,3	0,72	3,67	4678

По результатам расчетов молекулярной массы можно сделать вывод о том, что для цепи молекулы метилцеллюлозы при растворении как в физиологическом растворе, так и в растворе хлористоводородной кислоты характерно несколько пиков, при этом молекулярная масса полисахарида находится на уровне 70000 Да.

Молекула метилцеллюлозы имеет молекулярную массу от 10000 до 250000 Да. Ввиду этого можно предполагать, что вещество с молекулярной массой 115000 Да, идентифицированное в составе гидролизата – полисахарид метилцеллюлоза [36].

Проведена оценка стабильности физико-химических свойств гемодеривата в процессе хранения. Описанные выше результаты исследований показали, что разработанная технология гемодеривата из эритроцитной массы крови человека является воспроизводимой. Получаемое вещество можно охарактеризовать как депротеинизированный раствор низкомолекулярных пептидов с основными физико-химическими характеристиками, представленными в табл. 11 (см. выше «Физико-химическая характеристика гемодеривата эритроцитной массы крови человека»). Проведена оценка стабильности значений показателей физико-химических свойств гемодеривата в процессе хранения в лиофилизированном виде при температуре $(4\pm 2)^\circ\text{C}$. В качестве контрольных показателей выступали такие параметры, как pH, содержание аминного азота, хлоридов. Для

исследования готовили растворы гемодеривата с концентрацией 40 мг/мл по сухому веществу с использованием в качестве растворителя воды очищенной. Результаты анализа представлены в табл. 14.

Таблица 14

Исследование стабильности физико-химических показателей гемодеривата в зависимости от срока хранения в лиофилизированном виде

Срок хранения, мес.	Значения физико-химических показателей		
	pH	Содержание аминного азота, мг%	Содержание хлоридов, %
0	3,50±0,20	165,20±3,80	0,33±0,02
4	3,60±0,20	163,80±3,80*	0,35±0,02
12	3,60±0,20	168,00±4,90*	0,31±0,04

Примечание: * – $p > 0,05$ по сравнению со значением концентрации аминного азота через 0 мес хранения по t-критерию Стьюдента.

По результатам, представленным в табл. 14, можно сделать вывод, что значения физико-химических показателей водных растворов на основе гемодеривата не имеют статистически значимых различий при хранении в течение 12 мес. Таким образом, было выявлено, что технология гемодеривата является воспроизводимой, так же полученный продукт способен сохранять стабильность физико-химических параметров при хранении в лиофилизированном виде в течение 12 мес.

Таким образом, разработана технология ферментативного гидролиза эритроцитной массы крови человека для получения гемодеривата. Предложены способы предварительной обработки сырья (гемолиз для улучшения фермент-субстратного взаимодействия, вирусинактивация 1-й степени). Обоснован выбор в качестве протеолитического агента фермента пепсина с конечной концентрацией 2%. Определена оптимальная продолжительность гидролиза, составляющая 144 ч (6 сут.), обоснованная с точки зрения достижения

содержания в гидролизате максимального количества аминного азота и с позиции длительного выдерживания при значении рН активации фермента ($1,8 \pm 0,2$) для вирусинактивации (2-ая ступень) потенциально опасного в отношении гемотрансмиссивных инфекций сырья – эритроцитной массы крови человека. Оценены физико-химические свойства гемодеривата. Выявлено, что гемодериват эритроцитной массы крови человека в жидком состоянии представлял собой депротеинизированный раствор с высоким содержанием аминного азота ($165,20 \pm 3,80$) мг%, источником которого являлись низкомолекулярные пептиды, масса которых по результатам ВЭЖХ составляла от 1 до 6 кДа. Аминокислотный состав гемодеривата характеризовался наличием 11 заменимых и 7 незаменимых аминокислот. В высушенном виде гемодериват представлял собой пористую массу светло-желтого цвета с характерным запахом. Жидкий гемодериват, полученный по разработанной технологии, содержал сухого остатка 40 мг/мл.

ГЛАВА 4. Изучение биологической активности гемодеривата

4.1. Оценка токсичности гемодеривата

Для оценки токсичности раствора нативного гемодеривата (40 мг/мл по сухому веществу) применяли клеточную линию SPEV. Опыт проводили в соответствии с методикой оценки токсичности полуфабриката человеческого лейкоцитарного интерферона, изложенной в ФСП 42-0504-6946-11 «Интерферон человеческий лейкоцитарный (Интерферон альфа) лиофилизат для приготовления раствора для интраназального введения и ингаляций 1000 МЕ». По данной методике находили наибольшую концентрацию раствора гемодеривата, не оказывающую деструктивного действия на культуру клеток SPEV. В результате исследования было выявлено, что раствор гемодеривата с разведением в 50 раз средой 199 не оказывал дегенеративного действия на культуру клеток при совместной экспозиции в течение 2-х суток. Визуальная оценка качества с помощью микроскопа с увеличением в 100 раз показала, что клеточный монослой ровный, без признаков разрушения клеток.

Для определения максимальной концентрации раствора гемодеривата, не оказывающей негативного действия на культуру SPEV готовили разведения нативного раствора гемодеривата в 5, 10, 20, 30, 40 раз питательной средой 199. Показано, что концентрация раствора гемодеривата, разбавленного в соотношении 1:10, что соответствует концентрации 4 мг/мл по сухому веществу, является максимальной, при которой не отмечается дегенерации клеточного монослоя.

Таким образом, можно сделать вывод, что раствор гемодеривата с концентрацией 4 мг/мл и меньше по сухому веществу не проявлял токсических свойств по отношению к культуре перевиваемой клеточной линии SPEV.

4.2. Экспериментальное изучение антибактериальной активности гемодеривата

Как известно, пептиды катионной природы обладают бактериостатическим действием. Бактерицидные свойства низкомолекулярных пептидов обусловлены их электростатическим взаимодействием с клеточными стенками бактерий [125, 132]. Пептиды аккумулируются и ориентируются параллельно поверхности мембраны – мишени, затем электростатически взаимодействуют с анионными группировками фосфолипидных головок во многих участках, покрывая мембрану ковроводобным образом. По достижении определенной критической концентрации, происходит образование сквозных дыр в мембране – мишени, что приводит к лизису бактерии [7]. При этом пептиды не способны разрушать соматические клетки эукариот в виду особенностей заряда их клеточной стенки. Избирательное действие противомикробных пептидов обусловлено тем, что существуют различия между мембранами клеток эукариот и прокариот [96]. На поверхности клеток эукариот отсутствуют необходимые рецепторы для адгезии пептида.

Для того, чтобы установить природу пептидных соединений, входящих в состав гемодеривата из эритроцитной массы крови человека, а так для выявить номенклатуру присутствующих аминокислот и подтвердить преимущества ферментативного гидролиза, проводили анализ его аминокислотного состава.

По результатам аминокислотного анализа субстанции гемодеривата было выявлено, что в ее состав входит 18 аминокислот, 7 из которых незаменимые (табл. 15). Так же в составе сохранилась аминокислота пролин. В дальнейшей работе с биообъектами использовали растворы гемодеривата с рН, доведенным до значения $(7,0 \pm 0,2)$. Для определения общего суммарного заряда аминокислот, входящих в состав гемодеривата, и установления катионной или анионной природы пептидов высчитывали заряд каждой аминокислоты. В табл. 15 представлены данные о концентрации и

заряде аминокислот, входящих в состав гемодеривата при значении рН (7,0±0,2).

Таблица 15

Содержание и заряд аминокислот, идентифицированных в составе гемодеривата

№	Наименование аминокислоты	Концентрация, %	Заряд при рН=(6,8-7,2)
1	Аспарагиновая кислота + аспарагин	7,24	-
2	Глутаминовая кислота + глутамин	5,35	-
3	Серин	3,43	0
4	Гистидин	4,08	+
5	Глицин	3,33	0
6	Треонин*	3,32	0
7	Аргинин	2,63	+
8	Аланин	6,53	0
9	Тирозин	0,19	0
10	Цистин	0,6	0
11	Валин*	5,51	0
12	Метионин*	менее 1,0	0
13	Фенилаланин*	1,33	0
14	Изолейцин*	0,79	0
15	Лейцин*	7,13	0
16	Лизин*	9,23	+
17	Гидроксипролин	0,38	0
18	Пролин	5,93	0

Примечание: * – незаменимая аминокислота;
«-» – отрицательный заряд;
«+» – положительный заряд;
«0» – нейтральный заряд.

Для расчета суммарного заряда, которым обладают пептиды, входящие в состав гемодеривата, был вычислен заряд, приносимый от каждой аминокислоты, в диапазоне рН от 6,8 до 7,2. В результате было выявлено, что пептидная субстанция имеет положительный заряд за счет аминокислот: гистидина (4,08%), аргинина (2,63%), лизина (9,23%), которые в сумме составляют 16%, и отрицательный за счет аминокислот: аспарагина (7,24%), глутамина (5,35%), дающих в результате 12,6%. При этом суммарный заряд пептидной субстанции положительный, т.е. пептиды гемодеривата предположительно имеют катионную природу.

Антибактериальная активность раствора гемодеривата первоначально была выявлена в опыте с использованием рекомбинантного светящегося штамма *E.coli lum+*, далее была проведена оценка с использованием патогенных и условно-патогенных штаммов бактерий.

4.2.1. Оценка противомикробного действия гемодеривата на бактерии люминесцентного штамма *E.coli Lum+*

Была проведена оценка антагонистического действия полученной субстанции гемодеривата из эритроцитной массы крови человека с использованием прибора «Биотокс-10». Метод основан на определении изменения интенсивности свечения рекомбинантного штамма *E.coli lum+* при воздействии водорастворимых низкомолекулярных веществ, присутствующих в анализируемой пробе, по сравнению с контролем [16]. Среди существующих путей использования люминесцентных биосенсоров можно выделить их применение для определения антагонистической активности пробиотических культур [67, 76], для оценки антибактериальных свойств исследуемых материалов и субстанций [114, 115, 116, 127], а так же в области контроля экологического состояния воды, почвы и др. [80].

В нашей работе предложено использовать тест со светящимися бактериями для определения потенциальной антибактериальной активности раствора гемодеривата для выявления минимальной действующей концентрации,

влияющей на люминесцентный аппарат бактерий и подавляющей свечение. Люминесцентные бактерии оптимальным образом сочетают в себе различные типы чувствительных структур, подверженных биоповреждениям (клеточная мембрана, цепи метаболического обмена, генетический аппарат), с экспрессностью, объективным и количественным характером отклика целостной системы на интегральное воздействие токсикантов. Это обеспечивается тем, что люминесцентные бактерии содержат фермент люциферазу, осуществляющую эффективную трансформацию энергии химических связей жизненно важных метаболитов в световой сигнал на уровне, доступном для экспрессных и количественных измерений.

Использование в качестве биообъекта люминесцентных бактерий *E.coli lum+* позволило объективно определить характер антибактериального действия нового гемодеривата из эритромазсы крови человека на бактерии. В качестве контроля использовали физиологический раствор, выбор которого обоснован тем, что получение субстанции гемодеривата проходило с использованием хлористоводородной кислоты, обуславливающей наличие хлоридов в растворе гемодеривата, избыток или недостаток которых подавляет рост и развитие большинства живых бактериальных клеток, а так же перевиваемых клеточных линий. Для исключения негативного влияния на клетки эукариот параллельно был проведен опыт по исследованию токсических свойств на клеточной линии SPEV.

Уменьшение интенсивности биолюминесценции приняли пропорциональным антибактериальному эффекту. Действие исследуемой пробы гемодеривата на бактерии определялось по ингибированию их биолюминесценции в течение 24 ч экспозиции. Действие регистрировали через 30 минут, через 1 ч, 2 ч, 4 ч и 24 ч после внесения образца гемодеривата. Считали, что образец гемодеривата, подавлявший биолюминесценцию тест-штамма менее чем на 20%, обладал низкой антибактериальной активностью; от 20 до 50% – средней антибактериальной активностью; более, чем на 50% – выраженной антибактериальной активностью. Интенсивность подавления

биолюминесценции обозначали безразмерной величиной, имеющей как положительные значения, соответствующие уровню подавления биолюминесценции, так и отрицательные значения, соответствующие усилению биолюминесценции по сравнению с контролем.

Исследованию на приборе «Биотокс-10» подлежали три водных раствора гемодеривата:

- 1-ый раствор с концентрацией 40 мг/мл по сухому веществу (нативный гемодериват), рН=(6,8-7,4);
- 2-ой раствор с концентрацией 20 мг/мл по сухому веществу, рН=(5,5-6,0);
- 3-ий раствор с концентрацией 20 мг/мл по сухому веществу, рН=(6,8-7,4).

Результаты исследования антибактериальных свойств гемодеривата при действии на биолюминисцентный штамм показаны на рис. 11, 12, 13. На рис. 11 приведены данные исследования по определению индекса подавления биолюминесценции (ИПБ) штамма *E.coli lum+* раствором нативного гемодеривата (40 мг/мл).

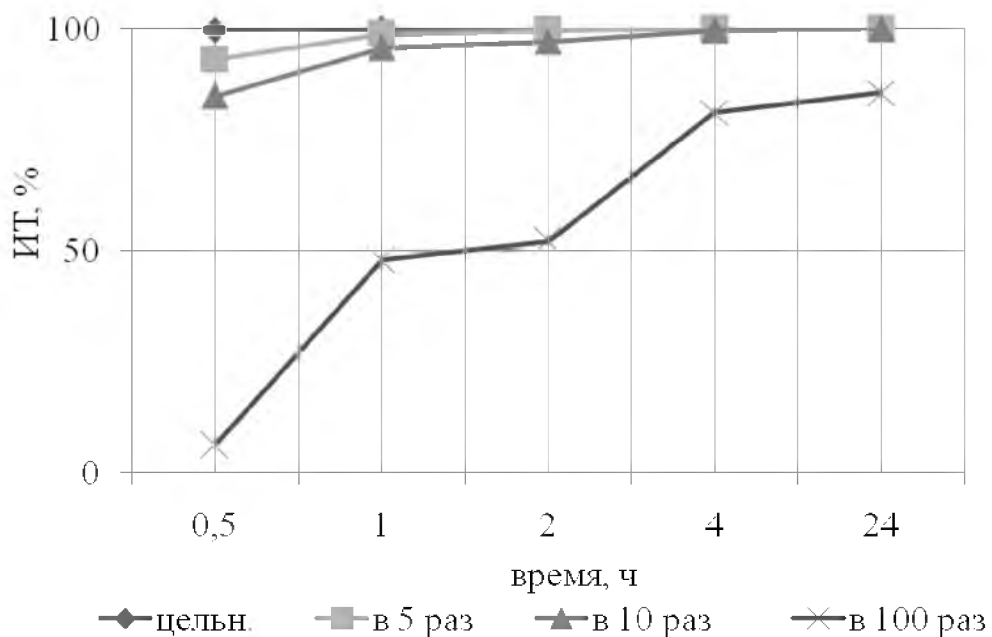


Рис. 11 Зависимость значения ИПБ от времени экспозиции и разведения раствора гемодеривата № 1 (40 мг/мл, рН от 6,8 до 7,4)

По данным, представленным на рис. 11, можно сделать вывод, что образец гемодеривата 40 мг/мл при разведении до 10-и раз обладал выраженным антибактериальным действием на биолюминисцентный штамм. Через 24 ч экспозиции свечения не наблюдалось (индекс подавления свечения бактерий достигал уровня 100%). При разбавлении цельного образца в 100 раз раствор обладал низким уровнем антибактериального действия до 40 мин экспозиции, проявлял среднюю антибактериальную активность в промежуток времени от 40 мин до 2 ч, и высокую антибактериальную активность после 2 ч выдерживания, при этом происходило практически полное подавление свечения. Учитывая, что исследуемый раствор гемодеривата содержал хлоридов не более 0,35%, что в 2,5 раза меньше, чем в физиологическом растворе, то присутствие ионов хлора не могло обуславливать токсичность и подавление биолюминесценции бактерий. Возможно, антибактериальное действие было обусловлено содержанием низкомолекулярных положительно заряженных пептидов, которые при минимальной концентрации проявляли выраженную антибактериальную активность через 24 ч экспозиции. Далее исследовали растворы гемодеривата №1 и №2 с концентрацией 20 мг/мл по сухому веществу. Раствор гемодеривата №1 имел рН от 5,5 до 6,0 (рис. 12).

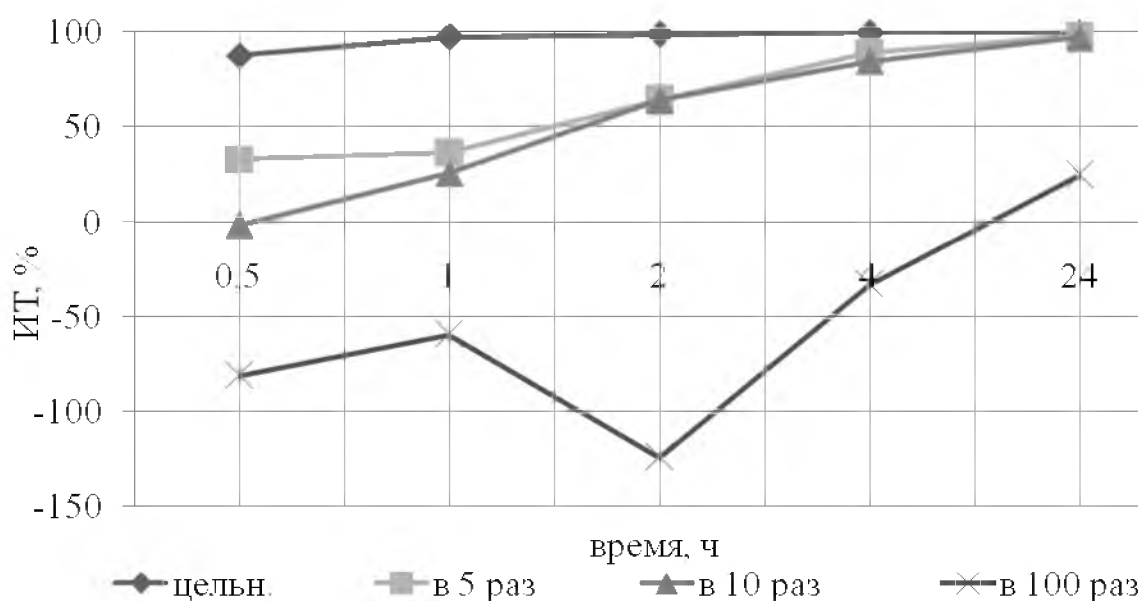


Рис. 12 Зависимость значения ИПБ от времени экспозиции и разведения раствора гемодеривата №2 (20 мг/мл, рН от 5,5 до 6,0)

При исследовании растворов гемодеривата с концентрацией 20 мг/мл по сухому веществу выявили как свойство подавления биолюминесценции, коррелирующее с антибактериальной активностью, так и усиление биолюминесценции рекомбинантных микроорганизмов при высокой степени разведения исходного гемодеривата. При исследовании свойств раствора № 2 выявлена выраженная антибактериальная активность на всех промежутках времени от 0,5 до 24 ч. При этом растворы, разбавленные в 5 и 10 раз обладали выраженным антибактериальным действием через 1,5 ч. При разбавлении раствора № 2 в 100 раз наблюдалось другое явление – усиление свечения в период времени до 14 часов. При анализе полученных данных можно сделать вывод о том, что спектр биологических свойств гемодеривата характеризуется наличием антибактериальных свойств при высоких концентрациях, а так же противоположным действием, выражающемся в стимуляции свечения – при низких концентрациях.

На рис. 13 представлены результаты определения зависимости интенсивности свечения от времени контакта бактерий с раствором № 3 гемодеривата и его разведений.

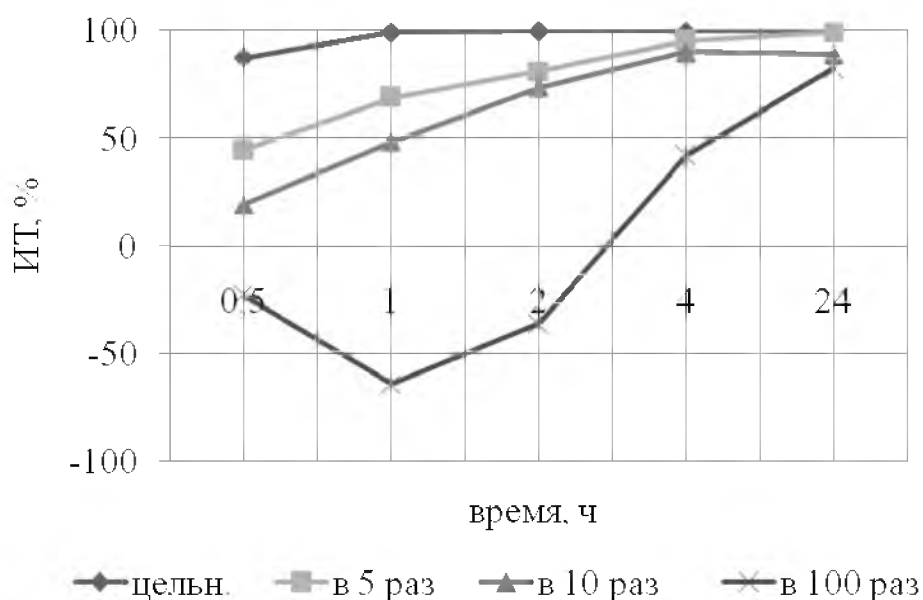


Рис. 13 Зависимость значения ИПБ от времени экспозиции и разведения раствора гемодеривата № 3 (20 мг/мл, pH от 6,8 до 7,4)

Полученные результаты (рис. 13) при исследовании раствора гемодеривата № 3 с концентрацией 20 мг/мл, рН (6,8-7,4) аналогичны предыдущим (рис. 12). Следовательно, при оценке антибактериальных свойств растворов № 2 и 3 и разведений в 5 и 10 раз их бактериостатические свойства были сходны и не зависели от сдвига рН. При разведении в 100 раз как раствора № 2, так и № 3, наблюдалось усиление билюминесцентного свечения с той разницей, что в последнем случае оно длилось до 3 ч экспозиции, в отличие от данных по раствору № 2, где свечение бактерий усиливалось до 14 ч экспозиции.

Антибактериальная активность цельного образца раствора гемодеривата эритроцитной массы крови человека 40 мг/мл и его разведений довольно высокая. Свойство растворов гемодеривата 20 мг/мл подавлять жизнедеятельность микроорганизмов, сохранялось на всем времени экспозиции при разведениях до 10-и раз. При этом низкие концентрации гемодеривата 0,2 мг/мл (при разведении в 100 раз) способны вызывать усиление свечения бактерий, скорее всего через активизацию метаболических процессов в клетках до полного истощения ресурсов микроорганизмов, что в конечном итоге приводит к снижению уровня их билюминесценции за счет достижения высокого уровня антибактериальных свойств.

Учитывая полученные результаты для дальнейших испытаний антибактериальной активности применяли раствор гемодеривата с минимальной концентрацией, вызывающей снижение билюминесценции бактерий через 24 часа экспозиции (выраженная антибактериальная активность) – 0,2 мг/мл.

4.2.2. Изучение антибактериальной активности гемодеривата на штаммы условно-патогенных микроорганизмов

Для оценки антибактериальных свойств положительно заряженных пептидов гемодеривата из эритроцитной массы крови человека был использован раствор № 3, рН (6,8-7,4) концентрацией гемодеривата, при которой зарегистрированы антибактериальные свойства по отношению к штамму *E.coli*

lum+ (см. глава 3.2.1) – 0,2 мг/мл. Оценку противомикробной активности проводили на штаммах клинических условно-патогенных аэробных бактерий методом серийных разведений в жидкой среде [51] (табл. 16). Исследование проводили на базе Пермского НПО «Биомед» под руководством Ефимовой М. Г.

Таблица 16

Оценка антибактериальной активности раствора гемодеривата № 3

Штамм	Характер роста микроорганизмов при концентрации гемодеривата, мг/мл				
	0,02	0,01	0,005	0,0025	0,002
<i>S. epidermidis</i> 3449	-	-	-	+	+
<i>S. epidermidis</i> 19	-	-	-	+	+
<i>S. aureus</i> 4570	-	-	-	+	+
<i>S. aureus</i> 4465	-	-	+	+	+
<i>E. coli</i> 1738	+	+	+	+	+
<i>P. aeruginosa</i> 1235	-	+	+	+	+
<i>Enterococcus</i> 417	-	+	+	+	+
<i>Enterococcus</i> 1704	-	+	+	+	+

В результате полученных данных отмечали антибактериальную активность во всех случаях, за исключением штамма *E. coli* 1738. При действии на штаммы *S. epidermidis* 3449 и 19, *S. aureus* 4570 отсутствие роста наблюдали при разведении в 40 раз (концентрация гемодеривата 0,005 мг/мл по сухому веществу), а при действии на *S. aureus* 4465 – при разведении в 20 раз (концентрация гемодеривата 0,01 мг/мл по сухому веществу). В случае со штаммами *Enterococcus* 417 и 1704 антибактериальный эффект отмечали при разведении в 10 раз (концентрация гемодеривата 0,02 мг/мл по сухому веществу). Штамм *P. aeruginosa* характеризовался умеренным ростом при

разведении раствора гемодеривата в 20 раз и больше (концентрация гемодеривата 0,01 мг/мл по сухому веществу). Таким образом, подтверждено наличие антибактериальной активности гемодеривата по отношению к представителям рода стафилококков, в частности, эпидермального и золотистого, рода энтерококков и синегнойной палочки.

Как было выявлено в опыте с биолюминесцентными бактериями, раствор гемодеривата в низких концентрациях обладал не только антибактериальными свойствами, но и стимулировал метаболизм бактерий *E.coli lum+*, усиливая их свечение (рис. 13). Следовательно, спектр действия гемодеривата зависел от его концентрации. Для дальнейших исследований интересным представлялось выявление других свойств с целью оценки всего спектра биологической активности гемодеривата.

4.3. Изучение местно-раздражающего действия гемодеривата при кожных аппликациях *in vivo*

Для оценки местно-раздражающего действия гемодеривата необходимо было выбрать оптимальный растворитель сухого вещества, обеспечивающий равномерное распределение и фиксацию на кожном покрове животных. Наиболее важным фактором при выборе растворителя гемодеривата явилось время испарения раствора с кожных покровов. Время испарения определяло комфорт при нанесении на кожный покров животных в дальнейших исследованиях стимуляции роста ворса с использованием в качестве модели морских свинок. Для уменьшения отрицательных последствий эмоционального стресса у животных было решено свести к минимуму время контакта с человеком при нанесении и фиксировании опытных растворов.

На первом этапе исследования определяли время испарения растворов гемодеривата 20 мг/мл по сухому веществу с применением в качестве растворителей воды очищенной и этилового спирта 70% с поверхности предметного стекла. Время испарения со стекла при объеме образца 50 мкл спиртового раствора гемодеривата не превышало 1 мин (в среднем $t_{\text{исп}}=(53\pm 6)$

сек, водного ($t_{исп}=(140\pm 11)$ сек). При оценке полученных результатов был сделан вывод о целесообразности использования спиртового раствора гемодеривата для кожных аппликаций животным.

При изучении кожно-раздражающего действия с использованием в качестве модели морской свинки было выявлено, что спиртовой раствор гемодеривата не вызывал покраснения, раздражения и других видимых изменений кожных покровов животных. Было отмечено, что после 10-го дня нанесения раствора гемодеривата скорость роста ворса в местах аппликаций увеличилась по сравнению с контролем (без нанесения раствора гемодеривата).

Для оценки ростостимулирующей активности использовали раствор гемодеривата 20 мг/мл в спирте с массовой долей этанола 70%. Результаты оценки влияния спиртового раствора гемодеривата на скорость роста ворса у экспериментальных животных представлены в табл. 17.

Таблица 17

Анализ влияния раствора гемодеривата на скорость роста ворса морской свинки в зависимости от времени.

Время, сут	Длина ворсинки [*] , мм	
	Контроль	Раствор
0	0	0
3	2,40±0,27	2,82±0,08
7	4,80±0,40	4,70±0,10
10	6,42±0,41	6,72±0,30*
14	7,00±0,21	9,74±0,29**
18	7,70±0,28	11,02±0,36**
21	8,10±0,23	11,40±0,33
24	9,10±0,34	15,08±0,33
27	10,86±0,26	16,78±0,37
31	13,92±0,31	17,04±0,24

Примечание: * – $p>0,05$; ** – $p<0,001$ (относительно контрольного значения длины ворсинок) по t -критерию Стьюдента.

Полученные данные показали, что при использовании спиртового раствора гемодеривата скорость роста ворса у морских свинок увеличивалась по сравнению со скоростью роста на контрольных зонах. Использование величины стандартного отклонения дало возможность графически оценить время начала и конца непосредственного влияния гемодеривата на скорость роста ворса, поскольку среднее значение длины ворсинок недостаточно полно отражало эту зависимость (рис. 14).

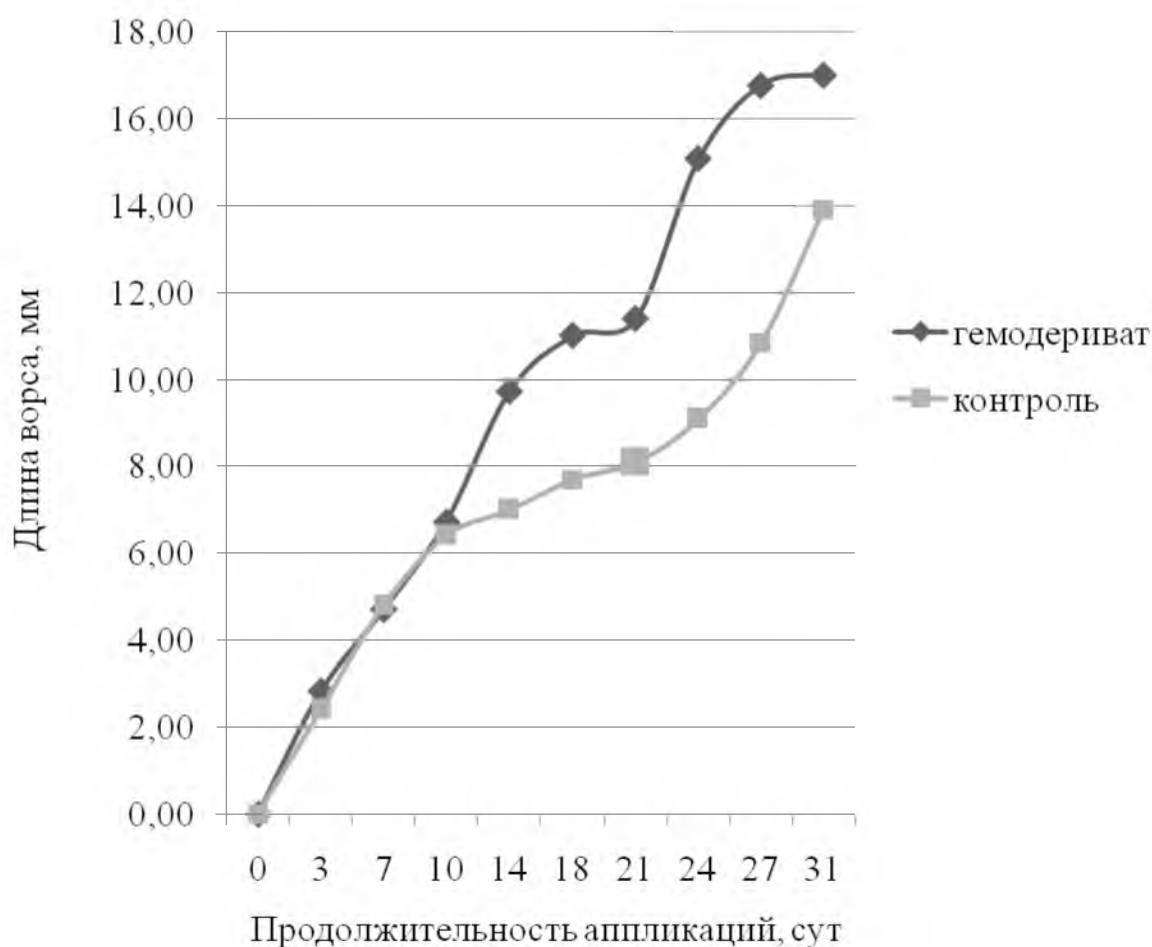


Рис. 14 Влияние накожных спиртовых аппликаций гемодеривата на скорость роста ворса морских свинок

По результатам анализа данных, представленных в табл. 17 и на рис. 14 можно сделать вывод, что фактическая и статистически достоверная разность в длинах ворсинок, а, следовательно, увеличение скорости их роста, замечена только после 14 дней воздействия раствора гемодеривата. По истечении 31 дня

был достигнут максимум длины ворса морских свинок текущего возраста (4 мес.) – около 18 мм. Таким образом, эффект спиртового раствора пептидного комплекса, выраженный в стимуляции скорости роста ворса, наступает после 14 дней ежедневных аппликаций. Кроме того, после 14 дней оценку длины ворса можно производить более адекватно.

4.4. Оптимизация контроля качества человеческого лейкоцитарного интерферона с использованием перевиваемой клеточной линии SPEV, выращенной на питательной среде с гемодериватом

В биотехнологии производства иммунобиологических препаратов важнейшим условием получения полноценного конечного продукта является использование высококачественных питательных сред. К основным компонентам естественных сред относятся белковые гидролизаты, которые традиционно изготавливаются из пищевого (филейная говяжья вырезка) и непищевого (технический казеин, рыбная кормовая мука и т.д.) сырья. Такие среды характеризуются высокими питательными свойствами и ростовыми характеристиками, но имеют неопределенный химический состав. Качественно-количественный состав таких питательных сред часто подбирается эмпирически, без обоснования использования тех или иных компонентов. Данная проблема решается на основе современного уровня знаний клеточного метаболизма, а так же использования высокоэффективных способов анализа состава и стандартизации компонентов натурального происхождения. Доля естественных питательных сред с использованием непищевого белкового сырья значительно меньше доли сред на основе пищевого сырья и составляет не более 15% от всего ассортимента выпускаемых в мире сред. В этой связи, становятся понятными стремления исследователей, занимающихся конструированием питательных сред, направленные на поиск непищевого белкового сырья, позволяющего изготавливать стандартизируемые питательные основы и среды [27, 53].

В условиях реального производства к питательным средам предъявляют дополнительные требования. Они должны быть эффективными по выходу целевого продукта, а полученные с их применением лекарственные средства – безопасными для человека. Кроме того, производство питательных сред должно быть также экономичным и конкурентоспособным [48].

Синтетические питательные среды, химический состав которых характеризуется точными концентрациями и легко воспроизводим, зачастую уступают по своим ростовым качествам натуральным средам неопределенного состава. Одним из многокомпонентных синтетических питательных субстратов является среда 199 [94]. Питательная среда 199 содержит множество компонентов, в том числе 20 аминокислот, 17 витаминов, коэнзимы, глюкозу, минеральные соли и некоторые другие вещества; среда полностью синтетическая. Среда 199 используется для длительного культивирования перевиваемых клеточных культур и обеспечивает высокую степень стандартности исследования. Недостатком является сложная технология с использованием дорогостоящих, главным образом, импортных реагентов. В условиях биотехнологического производства, где требуется большое количество сред для культивирования биообъектов, использование ПС 199 затратно. Разработка способа получения варианта питательного субстрата путем частичной замены среды 199 стандартизованным гидролизатом непищевого белка является одним из показателей высокотехнологичного производства, в частности, фармацевтического, имеющего большое количество белковых отходов.

Целью исследования явилось упрощение технологии процесса, снижение себестоимости конечного продукта и питательной среды на его основе для культивирования различных видов клеток. В частности, использовали клетки SPEV для оценки качества и ростовых свойств изготовленных вариантов питательной среды 199.

При преобразовании состава основными ингредиентами питательной среды 199, подлежащими замене, теоретически явились аминокислоты.

Раствором – заменителем стал депротеинизированный гемодериват крови человека с концентрацией сухих веществ 20 мг/мл. Гемодериват – протеолитический гидролизат эритромаcсы крови человека, которая в свою очередь является побочным продуктом производства природного лейкоцитарного интерферона; содержит низкомолекулярные пептиды с молекулярной массой до 6 кДа (см. результаты ВЭЖХ), а так же свободные аминокислоты. В табл. 18 представлен сравнительный анализ аминокислотного состава раствора гемодеривата (20 мг/мл) и среды 199.

Таблица 18

Содержание аминокислот в среде 199 и растворе гемодеривата (20 мг/мл)

Аминокислота		Содержание, мг/мл	
		среда 199	гемодериват
1	L-аргинин моногидрохлорид ²	0,70	0,53(<*)
2	L-гистидин моногидрохлорид ²	0,20	0,82(>*)
3	L-лизин моногидрохлорид ¹	0,70	1,85(>)
4	L-триптофан ¹	0,10	не опр. ³
5	L-фенилаланин ¹	0,25	0,27(>)
6	L-метионин ¹	0,15	0,02(<)
7	L-серин	0,25	0,69(>)
8	L-треонин ¹	0,30	0,66(>)
9	L-лейцин ¹	0,60	0,14(<)
10	L-изолейцин ¹	0,20	0,16(<)
11	L-валин ¹	0,25	1,10(>)
12	L-глутаминовая кислота	0,75	1,07(>)

Продолжение таблицы 18

13	L-аспарагиновая кислота	0,30	1,45(>)
14	L-аланин	0,25	0,13(<)
15	L-пролин	0,40	1,19(>)
16	Гидроокси L-пролин	0,10	-
17	Глицин	0,50	0,67(>)
18	L-глутамин	1,00	-
19	Тирозин ²	0,40	0,04(<)
20	L-цистин ²	0,20	0,12(<)

¹ – незаменимые аминокислоты;

² – полузаменимые аминокислоты;

³ – триптофан не определялся;

* – </>= меньше/больше, чем в исходной среде 199.

По данным в табл. 18 видно, что в составе раствора гемодеривата с концентрацией сухих веществ 20 мг/мл отсутствуют лишь 2 аминокислоты: гидроокси-L-пролин и L-глутамин. Суммарно незаменимых аминокислот больше в растворе гемодеривата (4,2 мг/мл), чем в среде 199 (2,55 мг/мл). Так же можно отметить, что в растворе гемодеривата присутствуют, но в меньшем количестве, чем в среде 199, аминокислоты такие, как L-аргинин моногидрохлорид (< в 1,3 р), L-метионин (< в 7,5 р), L-лейцин (< в 4,2 р), L-изолейцин (< в 1,25 р), L-аланин (< в 2 р), тирозин (< в 10 р), L-цистин (< в 1,6 р). Остальные 10 аминокислот присутствуют в бóльшем количестве по сравнению с составом среде 199 (L-гистидин моногидрохлорид (> в 4,1 р), L-лизин моногидрохлорид (> в 2,6 р), L-фенилаланин (> в 1,1 р), L-серин (> в 2,7 р), L-треонин (> в 2,2 р), L-валин (> в 4,4 р), L-глутаминовая кислота (> в 1,4 р), L-аспарагиновая кислота (> в 4,8 р), L-пролин (> в 3 р), глицин (> в 1,3 р)). Необходимо отметить, что аминокислоты гемодеривата природного

происхождения, поэтому скорость их усвоения клетками и клеточными структурами потенциально выше, чем синтетических аминокислот [21]. Можно предположить, что при выращивании клеток на среде, содержащей легкоусваиваемые компоненты, будет отмечаться более высокая скорость роста с достижением необходимых значений ИП клеток за меньшее время. В табл. 19 дана характеристика свойств аминокислот, присутствующих в среде 199, а так же в растворе гемодеривата как в недостаточном количестве, так и в избытке, и отсутствующих.

Таблица 19

Некоторые свойства аминокислот в эукариотических клетках, входящих в состав среде 199 и раствора гемодеривата

№	Наименование аминокислоты	Свойства
<u>Присутствует в составе гемодеривата</u>		
1	L-аргинин моногидрохлорид ²	Способствует выведению аммиака, участвует в процессах транспорта, задержки и экскреции азотсодержащих соединений
2	L-гистидин моногидрохлорид ²	Входит в состав активных центров большинства ферментов, способствует росту ткани клеточного монослоя
3	L-лизин моногидрохлорид ¹	Входит в состав практически всех белков, необходим для роста, восстановления тканей, производства ферментов. В процессе метаболизма с витамином С образует карнитин. Последний увеличивает адаптивную способность клеток.
4	L-фенилаланин ¹	Является протеиногенной аминокислотой и входит в состав белков всех известных эукариотических клеток. Участвует

		в гидрофобных взаимодействиях, играет значительную роль в процессе сворачивания и стабилизации белковых структур.
5	L-метионин ¹	Служит донором метильных групп при биосинтезе холина, а также гормонов. Является источником серы при биосинтезе цистеина, является мощным детоксикационным агентом; антиоксидант, способствует регенерации поврежденных клеточных тканей.
6	L-серин	Участвует в продукции клеточной энергии, превращается в цистеин в процессе метаболизма; участвует в биосинтезе глицина, метионина, цистеина, триптофана.
7	L-треонин ¹	Участвует в процессах роста тканей, биосинтезе изолейцина; способствует энергообмену в клетках.
8	L-лейцин ¹	Входит в состав всех природных белков, участвует в метаболизме углеводов, способствует регенерации поврежденных клеточных тканей.
9	L-изолейцин ¹	Участвует в образовании гликогена, участвует в метаболизме сахара.
10	L-валин ¹	Служит одним из исходных веществ при биосинтезе пантотеновой кислоты, участвует в образовании и запасании гликогена, необходим для поддержания нормального обмена азота в клетках.
11	L-глутаминовая кислота	Участвует в образовании глутамина, оказывает детоксикационное действие на аммиак; участвует в метаболизме других аминокислот,

		углеводов и жиров, в биосинтезе пролина и орнитина.
12	L-аспарагиновая кислота	Важнейший строительный материал для клеток, способствует превращению углеводов в энергию, участвует в образовании метионина, треонин и лизина, играет важную роль в обмене азотистых веществ.
13	L-аланин	Участвует в энергообразовании, является источником глюкозы (путем глюконеогенезиса), участвует в переаминировании аминокислот.
14	L-пролин	Участвует в продукции энергии; участвует в образовании биологически важных пептидов; важнейший белковый строительный материал клетки.
15	Глицин	Работает как азотистый пул при синтезе заменимых аминокислот, участвует при расщеплении гликогена и продукции энергии.
16	Тирозин ²	Протеиногенная аминокислота, входит в состав белков множества животных клеточных структур.
17	L-цистин ²	Ускоряет регенерацию и восстановление клеточных тканей.
<u>Отсутствует в составе гемодеривата</u>		
18	L-триптофан ^{1(*)}	Стимулирует рост тканей, способствует утилизации витаминов группы В.
19	Гидроокси L-пролин	важнейший белковый строительный материал животных клеток, синтезируется из пролина в присутствии аскорбиновой кислоты.
20	L-глутамин	является переносчиком аминогрупп; участвует

		в биосинтезе триптофана, гистидина, пуринов, рибофлавина, фолиевой кислоты; обезвреживает аммиак; вместе с аспарагином в клетке является резервным соединением для синтеза белка.
--	--	---

Примечание: ¹ – незаменимые аминокислоты;
² – полузаменимые аминокислоты;
* – триптофан не определялся.

По данным табл. 19 можно сделать вывод, что аминокислоты отсутствующие в составе гемодеривата – гидрокси L-пролин, L-глутамин – не являются незаменимыми и могут быть синтезированы из предшественников, которые присутствуют в нативном растворе, самими клетками в процессе жизнедеятельности. Таким образом, отсутствие этих аминокислот в растворе гемодеривата не несет негативного действия на скорость роста и пролиферации нормальных клеток. Ввиду вышеизложенного обоснован выбор гемодеривата как частичного заменителя состава коммерческой питательной среды 199.

Следующим этапом явилось исследование возможности частичной замены состава среды 199 с целью получения высокоэффективного субстрата для выращивания клеточных линий и получения монослоя в кратчайшие сроки. Изменение состава достигали путем частичной замены готовой питательной среды 199 раствором гемодеривата с концентрацией сухих веществ 20 мг/мл – наибольшая концентрация раствора, не оказывающая токсического действия на клеточную линию почек эмбриона свиньи. Для получения образцов экспериментальных питательных сред компоненты смешивали в различных пропорциях в асептических условиях с последующим определением их стерильности путем посева на дифференциально-диагностические питательные среды. Изучены физико-химические свойства экспериментальных питательных сред с различными соотношениями количества основного компонента среды 199 и гемодеривата – 50, 25 и 15%. Экспериментальные среды конструировали так, чтобы получить питательный субстрат, содержащий то максимальное

количество раствора гемодеривата, которое обеспечивало бы пролиферативные свойства, сопоставимые с таковыми на контрольной среде 199. Таким образом, главным ориентиром являлось максимальное сокращение среды 199 в составе экспериментального субстрата для снижения себестоимости конечного продукта. В ходе исследований предполагали, что замена питательной среды 199 раствором гемодеривата в количестве меньшем, чем 15 %, могла привести к более значительному повышению пролиферативных свойств. Но в таком случае снижение себестоимости экспериментальной среды было бы незначительным.

Вычисления объемов и масс вносимых компонентов делали эмпирически, опираясь на данные физико-химического анализа цельной среды 199 и раствора гемодеривата. Коррекцию pH питательных субстратов на основе среды 199 и гемодеривата проводили раствором бикарбоната натрия с концентрацией 7,5 %, стандартно используемого в технологии среды 199. В табл. 20 дана физико-химическая характеристика показателей состава серии экспериментальной питательной среды № 1, содержащей 50% раствора гемодеривата с концентрацией 20 мг/мл по сухому веществу и 50% среды 199 (конечная концентрация гемодеривата в экспериментальной питательной среде 10 мг/мл). Так же даны значения отклонений физико-химических параметров экспериментальной среды от аналогичных показателей цельной среды 199.

Таблица 20

Физико-химические показатели варианта экспериментальной питательной среды № 1*

Физико-химический показатель	Исходные данные		Экспериментальная среда	
	Гемодериват	Среда 199	Общее знач.	Δ^{**}
pH	3,60	7,00	7,00	-
Хлориды, г/л	1,65	5,20	3,43	-1,78
Глюкоза, г/л	0	1,00	0,50	-0,50
С ам. аз., не менее, г/л	0,78	0,13	0,46	0,33

Примечание : * – состав экспериментальной среды №1 – среда 199:раствор гемодеривата (20 мг/мл)=1:1; конечная концентрация гемодеривата 10 мг/мл;

** – отклонение от значений физико-химических показателей состава среды 199.

По данным, представленным в табл. 20, можно сделать вывод о том, что вариант питательного субстрата, содержащий 50% среды 199 и 50 % гемодеривата отличается от состава 100%-ой среды 199 содержанием некоторых компонентов. Для устранения отклонений в составе было необходимо дополнительное внесение таких компонентов, как глюкоза (0,5 г/л) и хлорид натрия (1,78 г/л). При этом не требовалось добавления дорогостоящих компонентов – аминокислот, поскольку содержание аминного азота было в норме – не менее 0,13 г/л.

В табл. 21 дана физико–химическая характеристика показателей состава серии экспериментальной питательной среды № 2, содержащей 25% раствора гемодеривата с концентрацией 20 мг/мл по сухому веществу и 75% среды 199 (конечная концентрация гемодеривата в экспериментальной питательной среде 5 мг/мл). Так же даны значения отклонений физико-химических параметров экспериментальной среды от аналогичных показателей цельной среды 199.

Таблица 21

Физико-химические показатели варианта экспериментальной питательной среды № 2*

Физико-химический показатель	Исходные данные		Экспериментальная среда № 2	
	Гемодериват	Среда 199	Общее знач.	Δ^{**}
рН	3,60	7,00	7,00	-
Хлориды, г/л	1,65	5,20	4,31	-0,89
Глюкоза, г/л	0	1,00	0,75	-0,25
С ам. аз., не менее, г/л	0,78	0,13	0,29	0,16

Примечание: * – состав экспериментальной среды №2 – среда 199:раствор гемодеривата (20 мг/мл)=3:1; конечная концентрация гемодеривата 5 мг/мл;

** – отклонение от значений физико-химических показателей состава среды 199 (100%).

В результате анализа данных, представленных в табл. 21, можно сделать вывод о том, что питательная среда № 2 требует некоторой корректировки по физико-химическим параметрам. Для устранения отклонений в составе варианта питательного субстрата было необходимо дополнительное внесение таких компонентов, как глюкоза (0,25 г/л) и хлорид натрия (0,89 г/л). По сравнению с данными, представленными в табл. 20, количество вносимых компонентов уменьшилось (было глюкозы 0,5 /л, хлорида натрия 1,78 г/л). Добавление дорогостоящих компонентов – аминокислот так же не требовалось, поскольку содержание аминного азота в норме – не менее 0,13 г/л.

В табл. 22 дана физико-химическая характеристика показателей состава экспериментальной питательной среды № 3, содержащей 15% раствора гемодеривата с концентрацией 20 мг/мл по сухому веществу и 85% среды 199 (конечная концентрация гемодеривата в экспериментальной питательной среде 3 мг/мл). Так же даны значения отклонений физико-химических параметров экспериментальной среды от аналогичных показателей цельной среды 199.

Таблица 22

Физико-химические показатели состава экспериментальной питательной среды № 3*

Физико-химический показатель	Исходные данные		Экспериментальная среда №3	
	Гемодериват	Среда 199	Общее знач.	Δ^{**}
рН	3,60	7,00	7,00	-
Хлориды, г/л	1,65	5,20	4,67	-0,53
Глюкоза, г/л	0	1,00	0,85	-0,15
С ам. аз. не менее, г/л	0,78	0,13	0,23	0,10

Примечание: * – состав экспериментальной среды №3 – среда 199:раствор гемодеривата (20 мг/мл)=5,6:1; конечная концентрация гемодеривата 3 мг/мл;

**– отклонение от значений физико-химических показателей состава среды 199 (100%).

В табл. 22 показаны данные, полученные при формировании третьего варианта состава питательного субстрата, содержащего 85% среды 199 и 15% гемодеривата. В результате анализа показателей, представленных в табл. 22, можно сделать вывод о том, что вариант питательного субстрата, содержащий 85% среды 199 и 15 % гемодеривата так же, как и первый, и второй варианты, отличается от состава 100%-ой среды 199 по содержанию глюкозы и хлорид-ионов. Для устранения отклонений в составе третьего варианта состава питательной среды было необходимо дополнительное внесение 0,15 г/л глюкозы и 0,53 г/л хлорид натрия. Количество вносимых дополнительно компонентов так же снизилось по сравнению с показателями вариантов сред, представленных в табл. 20 и 21. Добавление дорогостоящих компонентов – аминокислот так же не требовалось, поскольку содержание аминного азота в норме – не менее 0,13 г/л.

Оценку ростовых свойств серий питательных сред № 1, 2, 3, содержащих от 15% до 50% раствора гемодеривата, проводили с использованием клеточной линии SPEV, представляющей собой эпителиоподобные клетки почки эмбриона свиньи. Клеточная линия SPEV по стандарту должны образовывать сплошной монослой через 3-4 дня после посева и не деградировать в течение 4-х суток [93]. Пассирование проводили через (22 ± 2) ч после образования видимого монослоя. При этом на экспериментальной среде №3 видимый монослой образовывался после суток культивирования, соответственно клетки снимали на третьи сутки от момента засева. Концентрация клеток при пересеве составляла 50 тыс. кл./мл.

Главным показателем при оценке качества экспериментальных питательных сред и контрольной – среды 199 – явился ИП клеточной линии SPEV, который высчитывали в течение 5 последовательных пассажей (П). Индекс пролиферации – безразмерная величина, которая показывает, во сколько раз стало больше клеток, чем было засеяно. Результаты представлены в табл. 23.

Характеристика ростовых свойств питательных сред, содержащих раствор гемодеривата

Экспериментальная среда, №	Описание характера роста, ИП				
	1П	2П	3П	4П	5П
1	Клетки во взвеси	-	-	-	-
2	Клетки во взвеси, единичные прикрепились к стеклу	-	-	-	-
3	Ровный монослой, 7,4±0,4	Ровный монослой, 8,0±0,2	Ровный монослой, 8,5±0,5	Ровный монослой, 8,6±0,4	Ровный монослой, 8,7±0,5*
Контроль среда 199	Ровный монослой, 6,4±0,4	Ровный монослой, 5,9±0,3	Ровный монослой, 6,8±0,2	Ровный монослой, 6,8±0,2	Ровный монослой, 6,9±0,1

Примечание: «-» – роста не наблюдалось;

* – $p < 0,05$ (относительно значения на контрольной среде) по t-критерию Стьюдента.

Поскольку монослой не образовывался при первичном засеве на средах № 1 и 2, в дальнейших исследованиях применяли экспериментальную питательную среда № 3, на которой при выращивании клеток уже на первом пассаже образовался плотный монослой со средним значением ИП=7,4, превышающем контрольный (ИП=6,4).

Произвели расчет экономической эффективности от использования среды состава: 85% среды 199 и 15% водного раствора гемодеривата (20 мг/мл) с коррекцией количества хлоридов и глюкозы. Цеховая себестоимость 1 л раствора гемодеривата 20 мг/мл с концентрацией хлоридов 5,2 г/л и содержанием глюкозы 1,0 г/л составила 23,21 руб. Цеховая себестоимость питательной среды 199 составила 42,62 руб. Таким образом, цеховая себестоимость экспериментальной среды составила: $85\% \cdot 42,62 \text{ руб} + 15\% \cdot 23,21 \text{ руб} = 39,7 \text{ руб}$, что на 9% меньше, чем себестоимость среды 199.

Значения ИП как в исследуемой среде, так и в контроле, превышали значения предельно допустимого минимального значения (ИП не менее 4,0). При этом ИП во всех пассажах на экспериментальной среде № 3 превышал значение в контроле ($p < 0,05$). Необходимо отметить, что по результатам микроскопирования наблюдалось эффективное прикрепление клеток к стеклу до суток культивирования (15-18 часов), что приводило к образованию плотного монослоя уже на первые сутки культивирования, в отличие от контроля – среды 199, где монослой образовывался лишь на вторые сутки (24-28 часов).

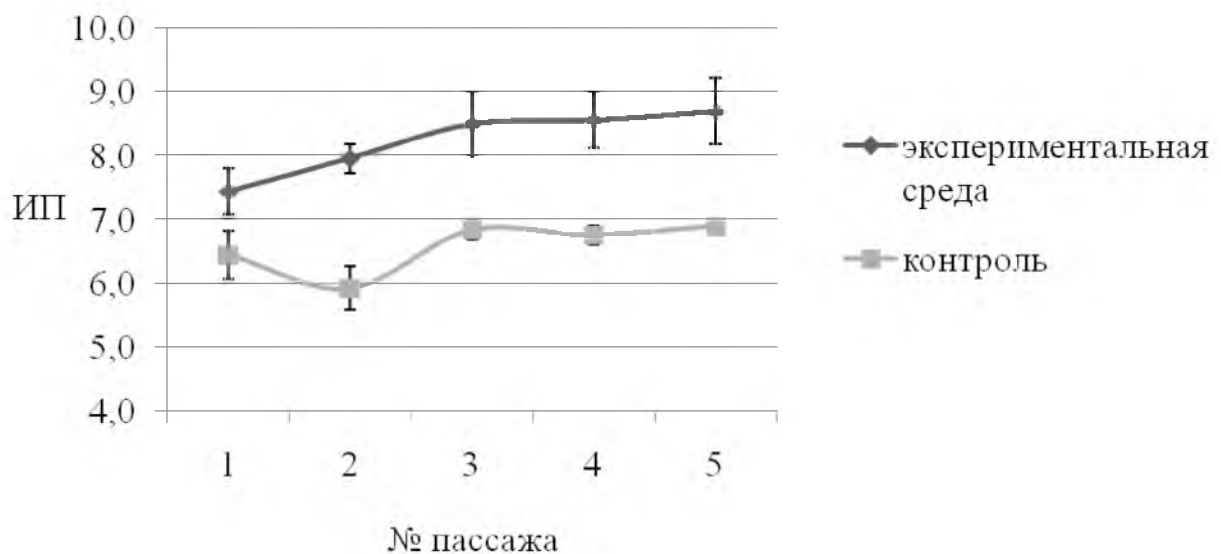


Рис. 15 Сравнительный анализ значений ИП контрольной и экспериментальной среды, содержащей гемодериват

По представленным на рис. 15 результатам следует, что при замене 15% питательной среды 199 раствором гемодеривата количество клеток соответствовало норме (количество снятых клеток более, чем в 4 раза превышало количество засеянных). Образование видимых через микроскоп островков монослоя клеточной линии SPEV при культивировании на экспериментальных питательных средах происходило раньше (через 15-18 часов от момента засева) по сравнению с контролем (через 24-28 часов). Соответственно через 72 часа регламентированного времени культивирования количество клеток, а, следовательно, и ИП на экспериментальных питательных

средах больше, чем на контрольной. Вероятнее всего, такой эффект связан с укорачиванием 1-ой фазы роста клеток – фазы адаптации. В результате этого бóльший процент клеток имел высокий потенциал прикрепления к стеклу и эффективной адгезии по всей площади флакона (субстрата), покрытой питательной средой. Актуально в этом случае рассмотрение вопроса о возможном перерождении клеток, в частности, в раковые, поскольку увеличение скорости роста является важным сигнальным фактором [103, 104] наряду с такими признаками, как:

1. морфологические изменения (мельчание или укрупнение, уменьшение адгезивной способности, увеличение ядра);
2. уменьшением зависимости клеток от добавления сыворотки;
3. нетребовательностью к качеству субстрата;
4. увеличением потенции к образованию опухолей.

Для исключения предположительной трансформации клеточной культуры в связи с увеличением скорости роста был поставлен опыт, подтверждающий неспособность предположительно перерожденной культуры SPEV прикрепляться к стеклу и делиться. Суть эксперимента заключалась в пересеве клеток на среду без добавления сыворотки КРС. Клеточная линия SPEV после культивирования в течение 5 пассажей на экспериментальной среде с гемодериватом и сывороткой КРС были пересеяны на среду с гемодериватом без сыворотки КРС. В результате эксперимента было выявлено, что клетки культуры не способны расти и размножаться в бессывороточной среде, а, следовательно, новых свойств не обрели. Таким образом, было исключено возможное перерождение клеточной линии под действием гемодеривата. Хотя данный эксперимент лишь условно доказывает отсутствие клеточной трансформации, но показывает, что клетки сохраняют свою специфичность и требовательность к питательным компонентам, что не свойственно раковым клеткам, которые способны делиться бесконечно с образованием поликлона.

Данные о значениях ИП на экспериментальной питательной среде №3 с нулевым сроком хранения использовали для сравнения свойств такой же среды,

содержащей гемодериват со сроком хранения 4 и 12 мес. Критерием оценки качества питательных сред с гемодериватом, хранившимся определенное время, явился индекс пролиферации клеточной линии SPEV. При этом экспериментальная питательная среда считалась эффективной до тех пор, пока значения ИП на ней превосходили значения ИП на контрольной среде 199.

Далее проводили исследование ростовых свойств питательной среды с гемодериватом в зависимости от срока его хранения. Как уже было сказано выше, наилучшие ростовые свойства показала экспериментальная среда № 3 с конечной концентрацией гемодеривата 3 мг/мл. Были поставлены последовательные серии опытов для выявления стабильности пролиферативных свойств лиофилизированного гемодеривата при его хранении в холодильнике при температуре (4 ± 2) °C в течение года. Стабильность гемодеривата в процессе хранения в сухом виде оценивали по пролиферативной активности питательных сред на его основе. В качестве культуры клеток использовали SPEV. Индексы пролиферации высчитывали в течение 5 пассажей. В таблице 24 приведены результаты оценки ростовых свойств питательных сред, содержащих гемодериват.

Таблица 24

Исследование стабильности пролиферативных свойств экспериментальной питательной среды, содержащей гемодериват, в зависимости от срока его хранения в сухом виде

Срок хранения гемодеривата в сухом виде, мес.		Значение ИП, у.е.				
		1П	2П	3П	4П	5П
0	Экспериментальная среда	7,4±0,4	8,0±0,2	8,5±0,5	8,6±0,4	8,7±0,5
4	Экспериментальная среда	7,7±0,3	7,5±0,2	8,8±0,3	8,5±0,4	8,3±0,4*
12	Экспериментальная среда	6,8±0,3	7,6±0,4	7,6±0,4	7,9±0,2	7,5±0,4**
	Контроль среда 199	6,4±0,4	5,9±0,3	6,8±0,2	6,8±0,2	6,9±0,1***

Примечание: * – $p > 0,05$, ** – $p < 0,05$ (относительно значения ИП при нулевом сроке хранения) по t -критерию Стьюдента; *** – $p < 0,05$ (относительно значений ИП на питательных средах, содержащих гемодериват со сроком хранения 0, 4, 12 мес).

По результатам исследований, представленных в табл. 24, можно сказать, что все экспериментальные питательные среды, содержащие гемодериват со сроком хранения от 0 до 12 мес, характеризовались активной пролиферацией клеточной линии SPEV со значениями ИП, превышающими контрольное значение. Необходимо отметить, что все экспериментальные питательные среды, обладали необходимым минимальным пролиферативным эффектом по отношению к клеточной линии SPEV (значение ИП не менее 4,0). Для наглядной оценки изменений ИП клеточной линии, происходящих в средах указанного состава, были нарисованы графики. Ниже приведен графический материал на основе данных табл. 24 (рис. 16 и 17), а так же дан обобщенный график (рис. 18) для сравнительного анализа характера изменений пролиферативных свойств экспериментальных сред при различных сроках хранения активного ингредиента – гемодеривата. Рассматривали возможность использования экспериментальных питательных сред в качестве субстрата для культивирования клеток SPEV с добавлением гемодеривата со сроком хранения 4 и 12 месяцев в сухом виде.

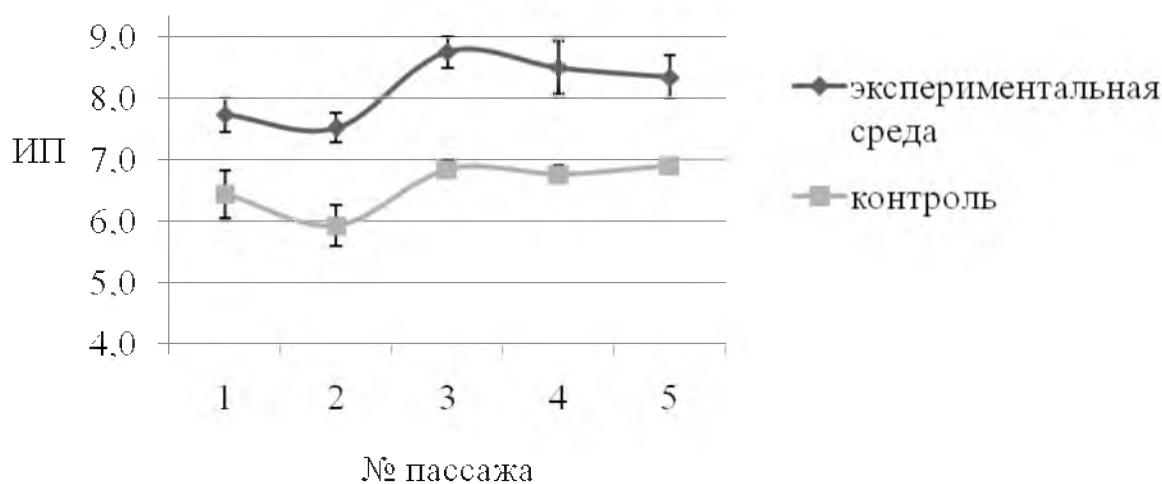


Рис. 16 Сравнительный анализ значений ИП контрольной и экспериментальной среды, содержащей гемодериват со сроком хранения 4 мес

На рис. 16 представлены значения ИП при культивировании клеток SPEV на среде, содержащей гемодериват со сроком хранения 4 месяца, по сравнению с контрольной средой 199. Следует отметить, что изменения значений ИП не имеют определенной закономерности при переходе от пассажа к пассажи, что

было выявлено при исследовании среды, содержащей гемодериват с нулевым сроком хранения (рис. 15). При этом на обоих графиках (рис. 15 и 16) четко прослеживается увеличение ИП на экспериментальных средах по сравнению с результатами, полученными на контрольной среде.

Напомним, что по результатам физико-химического анализа раствора гемодеривата со сроками хранения от 0 до 12 мес (табл. 14) был сделан вывод, что значения показателей не имеют статистически значимых различий при хранении в течение 12 мес. Следовательно, изменения показателей ИП на экспериментальных средах не связаны с физико-химическими свойствами гемодеривата, а зависят от активности пептидов, идентифицированных в его составе. Возможно, активность пептидов в процессе хранения снижается. Далее исследовали зависимость ИП клеточной линии SPEV от номера пассажа на экспериментальной среде, содержащей гемодериват со сроком хранения 12 мес, по сравнению с контролем (рис. 17).

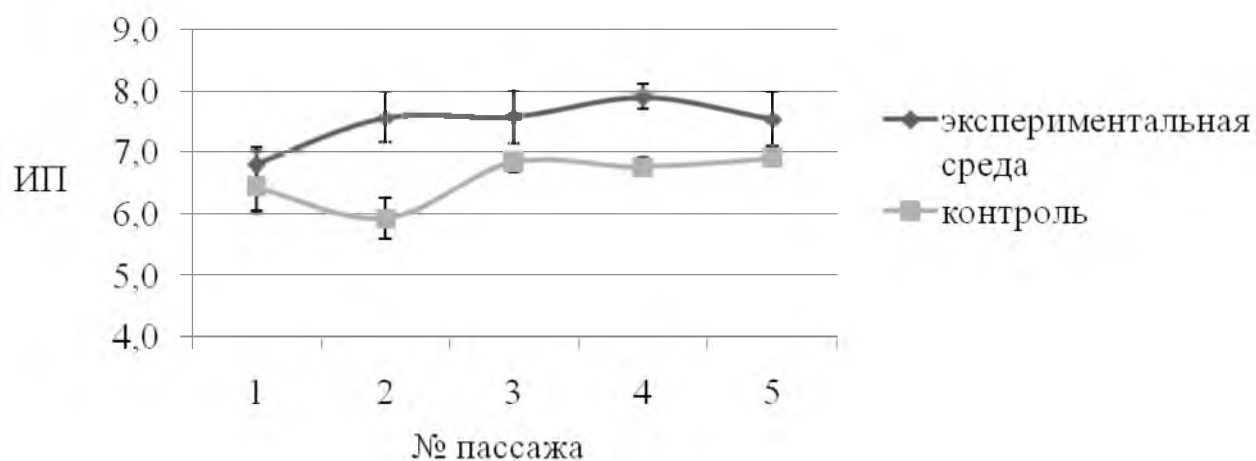


Рис. 17 Сравнительный анализ значений ИП контрольной и экспериментальной среды, содержащей гемодериват со сроком хранения 12 мес

При анализе данных рис. 17 можно сделать вывод о том, что после 12 месяцев хранения гемодеривата экспериментальная питательная среда на его основе не теряла своих свойств, выраженных в способности обеспечивать высокие значения ИП клеточной линии SPEV, при культивировании которой на такой среде отмечалось увеличение ИП на каждом пассаже по сравнению со

значением на контрольной среде 199. При этом статистически значимые различия значений ИП на среде, содержащей гемодериват со сроком хранения 12 мес, наблюдались при сравнении с показателями ИП на среде с гемодериватом нулевого срока хранения. Значения ИП сред снижались в прямой зависимости от срока хранения гемодеривата. Но во всех случаях контрольная питательная среда характеризовалась меньшими значениями ИП ($p < 0,05$) по сравнению со средами, содержащими гемодериват любого срока хранения.

На рис. 18 представлен обобщенный график, описывающий характер изменений значений ИП клеточной линии на экспериментальной среде с гемодериватом разного срока хранения по сравнению с контролем.

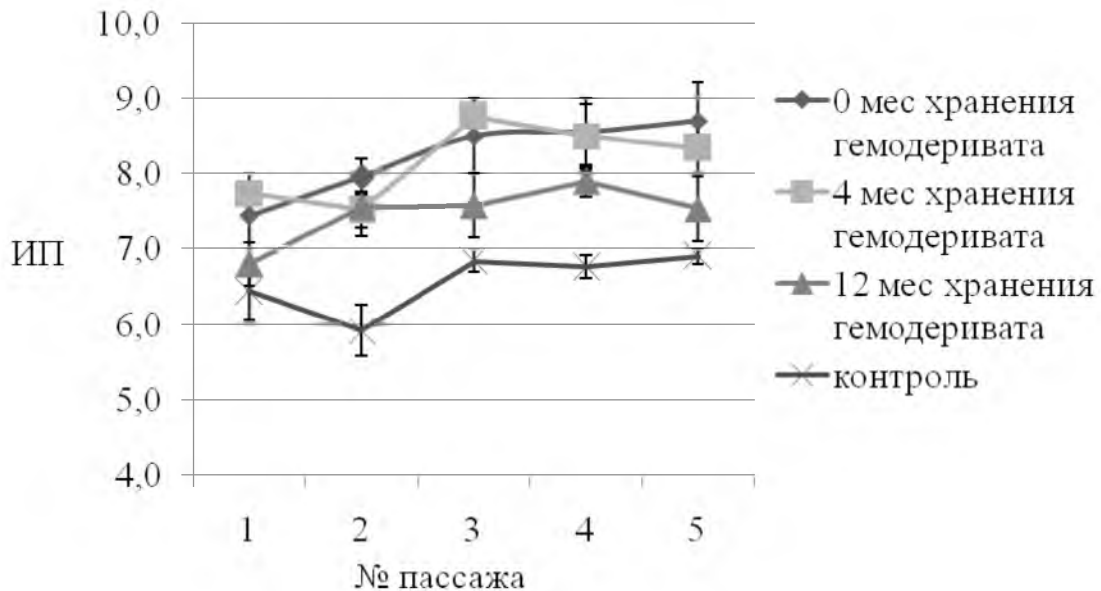


Рис. 18 Сравнительный анализ значений ИП экспериментальных сред, содержащих гемодериват с разными сроками хранения, по сравнению с контролем

На основе графического материала, представленного на рис. 15, 16, 17 и 18 можно утверждать, что:

1. изменение значений ИП во всех случаях (при культивировании на экспериментальной и контрольной питательной среде) не подчиняется строгому математическому закону и не является нормальным; для

описания таких процессов была использована величина среднего значения и стандартного отклонения при вероятности 95%;

2. значения ИП клеточной линии SPEV, выращенной на экспериментальной питательной среде, всегда выше, чем на контрольной ($p < 0,05$).

Индексы пролиферации клеточной линии SPEV имеют тенденцию незначительно снижаться при культивировании на экспериментальной среде, содержащей гемодериват со сроком хранения 12 месяцев в отличие от сред, содержащих гемодериват с меньшим сроком хранения. По данным графика видно, что среды, полученные на основе гемодеривата с нулевым и 4-х месячным сроком хранения, дают наиболее стабильные ИП клеточной линии SPEV. Можно сделать вывод, что культивирование клеточных линий с целью быстрого наращивания биомассы целесообразно проводить на средах, содержащих гемодериват с минимальным сроком хранения. В производственных условиях в целях выращивания и поддержания культуры можно рекомендовать к использованию экспериментальные среды, содержащие гемодериват с любой из исследованных продолжительностью хранения, поскольку значения ИП клеток на них выше, чем на контрольной среде 199.

В связи с этим, эффективность использования сред с гемодериватом будет обоснованной до тех пор, пока значения ИП клеток на них будут выше, чем на контрольной среде. Соответственно, допустимо использование питательных сред, содержащих лиофилизированный гемодериват со сроком хранения 12 месяцев.

Проведена оценка противовирусной активности препаратов ЧЛИ с использованием клеточной линии SPEV, выращенной на питательной среде, содержащей гемодериват. На экспериментальной питательной среде № 3 была получена биомасса клеточной линии SPEV. Культивирование клеточной линии проводили по стандартной методике путем пересевания в течение 5 пассажей с 3-4 суточных циклом. Качество клеток, полученных при культивировании на среде, содержащей гемодериват, оценивали по возможности их применения для

оценки противовирусной активности полуфабриката интерферона. Критериями качества клеток выступали следующие параметры:

1. Клетки образуют монослой.
2. Не способны расти на среде без содержания сыворотки КРС.
3. Обеспечивают возможность размножения вируса внутри себя.

В процессе исследований было выявлено и доказано, что клетки SPEV, выращенные на экспериментальной среде № 3, имеют потенциал к формированию монослоя, причем в период времени, по продолжительности меньший, чем на контрольной питательной среде.

Оценивали возможность использования клеточной линии SPEV, выращенной на экспериментальной питательной среде для определения противовирусной активности интерферона по сравнению с клеточной линией SPEV, выращенной на контрольной – среде 199. Специфическую активность определяли на 6-и производственных сериях препарата ЧЛИ. Результаты представлены в табл. 25.

Таблица 25

Оценка противовирусной активности интерферона с использованием клеточной линии SPEV, выращенной на среде с гемодериватом № 3 и на контрольной – среде 199

Питательный субстрат для выращивания клеточной линии SPEV	Нагрузка клеток SPEV в лунке планшета, ед/мл	Доза внесенного вируса, у.е.	Противовирусная активность интерферона, МЕ/амп.
Среда с гемодериватом № 3	300000	10^{-4}	1944±0,0
Контроль (среда 199)	300000	10^{-4}	1944±0,0

Из полученных результатов следует, что серии интерферона соответствуют требованиям ФСП ЛС 001078-130711 по показателю специфической активности (см. прил. «Протокол определения специфической активности

препарата «Интерферон человеческий лейкоцитарный интерферон альфа лиофилизат для приготовления раствора для интраназального введения и ингаляций 1000 МЕ» производства ФГУП «НПО «Микроген» Министерства здравоохранения Российской Федерации филиал в г. Пермь «Пермское НПО «Биомед» с использованием культуры клеток SPEV, культивируемой на питательной среде 199, изготовленной ФГУП «Предприятие по производству бактериальных и вирусных препаратов Института полиомиелита и вирусных энцефалитов им. М. П. Чумакова РАМН», а так же на экспериментальной полусинтетической питательной среде, содержащей гемодериват эритроцитной массы крови человека). Таким образом, разработанный состав экспериментальной среды №3, содержащей 85% среды 199 и 15% раствора гемодеривата, конечная концентрация которого в готовом субстрате составляла 3 мг/мл по сухому веществу, позволяет культивировать на ее основе клеточную линию SPEV с достижением значений ИП выше, чем на контрольной среде – 199. При этом клеточную линию, культивируемую на такой среде, можно использовать в технологии ЧЛИ на стадии определения специфической активности готового препарата.

ВЫВОДЫ

1. Разработана технология ферментативного гидролиза эритромысы крови человека для получения гемодеривата, включающая в себя предварительную обработку исходного сырья – гемолиз для улучшения фермент-субстратного взаимодействия с последующим выдерживанием на водяной бане при значении рН ($1,8 \pm 0,2$). Обоснован выбор в качестве протеолитического агента фермента пепсина с конечной концентрацией в гидролизуемой смеси 2%. Определена оптимальная продолжительность гидролиза, составлявшая 144 ч (6 сут.), обоснованная с точки зрения достижения содержания в гидролизате максимального количества аминного азота и с позиции длительного выдерживания при значении рН активации фермента ($1,8 \pm 0,2$) для вирусинактивации потенциально опасного в отношении гемотрансмиссивных инфекций сырья – эритромысы крови человека.

2. Показано, что гемодериват из эритромысы, полученный по разработанной технологии, характеризовался значением рН ($3,50 \pm 0,20$), содержал аминного азота ($165,20 \pm 3,80$) мг %, высокомолекулярные белки отсутствовали. Определены молекулярные массы пептидов, составляющие по результатам ВЭЖХ от 1 до 6 кДа с преобладанием компонентов с молекулярной массой 6 кДа. При анализе аминокислотного состава выявлено наличие 11 заменимых и 7 незаменимых аминокислот. В высушенном виде гемодериват представлял собой пористую массу светло-желтого цвета с характерным запахом. После сушки масса сухого остатка составляла ($40,00 \pm 3,75$) мг/мл.

3. Разработан новый состав питательной среды для культивирования клеточной линии SPEV, содержащей 85% среды 199 и 15% раствора гемодеривата (конечная концентрация гемодеривата в экспериментальной среде 3 мг/мл по сухому веществу). Значения индексов пролиферации клеточной линии SPEV как в исследуемой среде, так и в контроле, превышали показатель предельно допустимого минимального значения (не менее 4,0). При

этом индекс пролиферации клеток на всех пассажах в экспериментальной среде превышал значение в контроле ($p < 0,05$). Показана возможность использования питательных сред, содержащих гемодериват со сроком хранения до 12 мес в сухом виде. Экономическая эффективность использования экспериментальной питательной среды по сравнению с контрольной составила 9%.

4. Показана возможность использования экспериментальной питательной среды состава 85% среды 199 и 15% раствора гемодеривата для оценки противовирусной активности полуфабриката человеческого лейкоцитарного интерферона. Доказано, что клетки линии SPEV, выращенной на экспериментальной питательной среде, чувствительны к вирусу везикулярного стоматита и могут быть использованы при оценке специфической активности – защитного противовирусного действия человеческого лейкоцитарного интерферона альфа.

5. Определена антибактериальная активность гемодеривата на культуре рекомбинантного светящегося штамма *E.coli lum+* при разведении до 2 мг/мл. При этом низкие концентрации гемодеривата (0,2 мг/мл) вызывали усиление свечения бактерий до 120 %. Выявлены антибактериальные свойства гемодеривата при действии на культуры аэробных условно-патогенных микроорганизмов с нагрузкой $1,5 \cdot 10^8$ КОЕ/мл методом серийных разведений. При действии на штаммы *S. epidermidis*, *S. aureus* отсутствие роста наблюдалось при концентрации гемодеривата 0,005 мг/мл. В случае со штаммами *Enterococcus* антибактериальный эффект замечен при концентрации гемодеривата 0,02 мг/мл. Рост штамма *P. aeruginosa* наблюдался при концентрации гемодеривата 0,01 мг/мл и ниже.

Выявлена активность гемодеривата, выраженная в стимуляции роста ворса на экспериментальной модели морской свинке. Показано, что аппликации спиртового раствора гемодеривата 20 мг/мл по 50 мкл в сутки увеличивали скорость роста ворса животных по сравнению с контролем (аппликации 70% этиловым спиртом) после 14 дней воздействия, не вызывая при этом кожно-

раздражающего действия. По истечении 31 дня ворс достигал максимума длины, характерной для морских свинок текущего возраста (4 мес.) – около 18 мм. Длина ворса после 14 дней аппликаций достигала показателя на 33% больше, чем контрольная длина.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Создание и освоение новых высокоэффективных технологий, способствующих увеличению выхода готовых продуктов, является важной задачей современного биотехнологического производства. Такие технологии все шире используются в настоящее время и позволяют грамотно и экономически целесообразно применять дорогостоящее сырье. Это касается и отходов, имеющих определенный биотехнологический потенциал, выражаемый в особенностях состава, наличии аналогичных источников получения и возможных методах переработки. Например, производство природного интерферона из крови человека сопровождается образованием большого количества отхода - эритромаcсы, дефицитной в плане источника ее выделения и характеризующейся полноценным аминокислотным составом белков, входящих в ее состав. Данный отход не получил широкого применения в неизменном виде ввиду потенциальной опасности вирусной нагрузки такого сырья. Известен способ переработки такого отхода путем ферментативного расщепления исходного субстрата с целью получения компонента питательной среды для культивирования бактериофагов (Ворошилова, 1992), что является недостаточным для грамотной утилизации всего образующегося объема эритромаcсы. Предприятия научно-производственного объединения «Микроген», перерабатывающие человеческую кровь, сосредоточены в таких городах России, как Пермь, Уфа, Томск др. [25]. Подобный продукт образуется так же на станциях переливания крови, количество которых в стране по данным на 2012 год, составляет 79 и это число постоянно растет [85]. Данные факты побудили к дальнейшему исследованию биологического потенциала отхода производства интерферона эритромаcсы крови человека и продуктов ее переработки.

Таким образом, поиск методов переработки эритромаcсы с целью получения функциональных продуктов на ее основе не только приведет к оптимизации и повышению рентабельности производств, в которых

используется человеческая кровь, но и к минимизации технологических потерь со снижением неблагоприятного влияния не утилизируемых белковых отходов на экологическое равновесие в природе.

Одним из перспективных методов переработки эритромаcсы донорской крови, по-нашему мнению, является гидролиз - распространенный метод переработки белковых веществ для производства ценных продуктов. На основе белковых гидролизатов получают препараты, которые широко применяют на практике. Понятно, что качество и свойства белковых гидролизатов, предназначенных для различных областей применения, обусловлены составом исходного сырья, способом гидролиза и последующей обработкой полученного продукта.

На первом этапе работы исследовали продукты гидролиза эритромаcсы с использованием протеолитических ферментов- пепсина и трипсина. Поскольку эритромаcса – белковый субстрат, в качестве показателя эффективности гидролиза использовали количество аминного азота в конечном гидролизате. Процесс получения гидролизата эритромаcсы с помощью сухого пепсина характеризовался меньшими трудностями на стадии очистки по сравнению с процессом получения гидролизата с использованием трипсина. Физико-химический анализ полученных гидролизатов показал, что пепсин обеспечивает наибольшее содержание аминного азота в конечном продукте. В качестве гидролизующего агента в дальнейшей работе использовали пепсин.

Основной составной единицей эритромаcсы выступал эритроцит – форменный элемент крови в виде объемного двояковогнутого диска, в котором заключена главная мишень гидролиза – белок гемоглобин. Изучение перечня пептидных фрагментов гемоглобина позволило сделать вывод о высоком биотехнологическом потенциале такого белка. В литературе имеются сведения об изучении действия более 300 пептидов - структурных единиц гемоглобина на культуры опухолевых и нормальных клеток. В результате выявлено, что более 75% этих пептидов оказывают выраженное пролиферативное или антипролиферативное действие хотя бы на одну культуру [120]. Таким образом,

разрушение внешней стенки эритроцитов для высвобождения гемоглобина явилось неотъемлемой частью предгидролизной обработки эритрономассы. Для разрушения эритроцитов применяли способ гемолиза, который заключался в применении последовательных процедур замораживания-дефростации, обеспечивающие дезинтеграцию стенок эритроцитов и выход белка гемоглобина во внешнюю среду. Наличие данной процедуры явилось важным этапом в подготовке сырья к гидролизу, а именно для увеличения площади фермент-субстратного взаимодействия.

Для исключения возможного заражения продуктов гидролиза эритрономассы вирусным материалом после гемолиза применяли метод термообработки сырья: выдерживание на водяной бане при температуре 90 °С при кислотном значении рН от 1,6 до 2,0 в течение 1 часа [99]. Подкисление проводили ввиду того, что многие возбудители гемотрансмиссивных инфекций неустойчивы при низких значениях рН. Данная операция явилась первой ступенью в двойной вирусинактивации возможных гемотрансмиссивных инфекций в исходном сырье.

Разработана технология гидролиза предварительно гемолизированной и термообработанной эритрономассы, заключающаяся в том, что сырье разводили в 3,5 раза, доводили значение рН до точки активации фермента ($1,8 \pm 0,2$), добавляли 2 % сухого пепсина, выдерживали при температуре (36 ± 1) °С в течение 144 ч. Кроме того, ежедневно осуществляли контроль значения рН и при необходимости доводили до значения активации пепсина. При данных параметрах течения гидролиза добивались наибольшего содержания аминного азота в конечном гидролизате. При гидролизе эритрономассы мы преследовали так же целью вирусинактивацию потенциально опасного сырья за счет длительного выдерживания при низком значении рН, подобно процессу вирусинактивации полуфабриката интерферона (выдерживание при рН ($2,2 \pm 0,2$) в течение не менее 120 ч). По этой причине ориентировались на более продолжительное время гидролиза. Ввиду того, что от количества вносимого

фермента напрямую зависела себестоимость конечного гидролизата, ориентировались на его наименьшую концентрацию.

Продукт, полученный в результате технологии – гидролизат эритромассы – характеризовался неудовлетворительным внешним видом при визуальной оценке: мутный раствор темно-коричневого цвета. Осуществлен поиск метода улучшения внешнего вида гидролизата эритромассы. В качестве осветляющего агента использовали перекись водорода. Получен гидролизат эритромассы, осветленный с использованием 15% перекиси водорода, вводимой в количестве 5,33% от исходного объема гидролизата. После центрифугирования смеси осветляемого продукта с перекисью водорода получали прозрачный раствор гидролизата светло-желтого цвета без опалесценции.

Для стабилизации раствора гемодеривата и сохранения всех низкомолекулярных веществ, полученных в результате гидролиза, использовали щадящий метод – лиофилизацию. Гидролизат эритромассы в сухом состоянии – растворимая в воде и этаноле гидрофильная пористая масса светло-желтого цвета с характерным запахом и концентрацией сухих веществ 40 мг/мл.

Оценку физико-химических свойств раствора гемодеривата проводили по основным параметрам, предъявляемым к качеству питательных сред и их компонентам: показатель рН, концентрация аминного азота, содержание хлоридов. Поскольку гидролиз проводили с использованием фермента, то в конечном продукте определяли так же его активность, после лиофильного высушивания определяли массу сухого остатка. Так как гидролиз эритромассы проводили с использованием одного фермента пепсина, то в конечном продукте контролировали содержание белковых веществ в реакции с трихлоруксусной кислотой. Исследованию подлежал раствор гемодеривата (40 мг/мл по сухому веществу) и обладал следующими физико-химическими свойствами: рН от 3,3 до 3,7; количество аминного азота от 161,4 до 169,0 мг %; концентрация хлоридов от 0,31 до 0,35 %; активности пепсина не обнаружено; реакция с ТХУ отрицательная. Таким образом, гемодериват характеризовался

кислым значением рН, не содержал крупных белковых частиц и поэтому был назван депротеинизированным комплексом. Выявлено, что предложенный способ выделения гемодеривата позволяет получать полностью освобожденный от протеолитического агента раствор.

Определены молекулярные параметры соединений, входящих в состав гемодеривата, методом ВЭЖХ при длине волны 280 нм. Выявлено, что основной состав идентифицированных веществ представлен низкомолекулярными пептидами от 1 до 6 кДа.

Проведена оценка стабильности значений показателей физико-химических свойств гемодеривата в процессе хранения в лиофилизированном виде при температуре (4 ± 2) °С. Для исследования готовили растворы гемодеривата с концентрацией 40 мг/мл по сухому веществу с использованием в качестве растворителя воды очищенной. В результате было выявлено, что значения физико-химических показателей водных растворов на основе гемодеривата не имеют статистически значимых различий при хранении в течение 12 мес. Технология гемодеривата является воспроизводимой, так же полученный продукт способен сохранять стабильность физико-химических параметров при хранении в лиофилизированном виде в течение 12 мес.

Изучение биологической активности гемодеривата явилось основной целью выполнения работы. Исследовали токсичность раствора гемодеривата (40 мг/мл по сухому веществу) с применением клеточной линии SPEV. Была определена максимальная концентрация раствора гемодеривата, при которой не отмечалось дегенерации клеточного монослоя. Раствор гемодеривата с содержанием сухих веществ 4 мг/мл не оказывал дегенеративного действия на культуру клеток при совместной экспозиции в течение 2-х суток. В результате визуальной оценки качества клеток с помощью микроскопа с увеличением в 100 раз было выявлено, что клеточный монослой ровный, без признаков разрушения клеток. Таким образом, можно сделать вывод, что раствор гемодеривата с концентрацией 4 мг/мл и меньше по сухому веществу не

проявлял токсических свойств по отношению к культуре перевиваемой клеточной линии SPEV.

По результатам аминокислотного анализа субстанции гемодеривата было выявлено, что в ее состав входит 18 аминокислот, 7 из которых незаменимые. Преобладали аминокислоты, такие как аспарагиновая кислота + аспарагин, аланин, лейцин, лизин. Эмпирическим путем был вычислен суммарный заряд аминокислот, входящих в состав пептидов гемодеривата при значении рН от 6,8 до 7,2. Суммарный заряд пептидной субстанции положительный, т. е. пептиды гемодеривата предположительно имеют катионную природу. Как известно, пептиды катионной природы обладают антибактериальным действием. Такое свойство низкомолекулярных пептидов обусловлено их электростатическим взаимодействием с клеточными стенками бактерий. По достижении определенной критической концентрации происходит образование сквозных дыр в мембране - мишени, что приводит к лизису бактерии.

Ввиду вышесказанного была оценена антибактериальная активность гемодеривата. В качестве биообъекта был использован рекомбинантный светящийся штамм *E.coli lum+*. Метод основан на определении изменения интенсивности свечения рекомбинантного штамма *E.coli lum+*, которое коррелирует с антибактериальным действием, при воздействии водорастворимых низкомолекулярных веществ, присутствующих в анализируемой пробе, по сравнению с контролем – физиологическим раствором. Выявлено, что гемодериват обладал выраженной антибактериальной активностью. Свойство раствора гемодеривата 20 мг/мл, выраженное в подавлении жизнедеятельности микроорганизмов, сохранялось на всем промежутке времени экспозиции при разведениях до 10-и раз. При этом низкие концентрации гемодеривата 0,2 мг/мл (при разведении в 100 раз) вызывали усиление свечения бактерий, скорее всего через активизацию метаболических процессов в клетках до полного исчерпания ресурсов микроорганизмов, что в конечном итоге приводило к снижению уровня их биолюминесценции за счет достижения высокого уровня антибактериальных

свойств. Можно сделать вывод, что раствор гемодеривата в низких концентрациях обладал не только антибактериальными свойствами, но и стимулировал метаболизм бактерий *E.coli lum+*, усиливая их свечение.

Оценку противомикробной активности проводили с использованием штаммов условно-патогенных аэробных бактерий методом серийных разведений в жидкой питательной среде. По результатам титрации во всех случаях, кроме штамма *E.coli 1738*, наблюдался антибактериальный эффект. При действии на штаммы *S. epidermidis 3449* и *19*, *S. aureus 4570* отсутствие роста наблюдалось при разведении в 40 раз (концентрация гемодеривата 0,005 мг/мл по сухому веществу), а при действии на *S. aureus 4465* – при разведении в 20 раз (концентрация гемодеривата 0,01 мг/мл по сухому веществу). В случае исследования антибактериального действия на штаммы *Enterococcus 417* и *1704* антибактериальный эффект был замечен при разведении в 10 раз (концентрация гемодеривата 0,02 мг/мл по сухому веществу). Подавление жизнедеятельности штамма *P. aeruginosa* наблюдалось при разведении раствора гемодеривата в 10 раз (концентрация гемодеривата 0,01 мг/мл по сухому веществу). Таким образом, подтверждено наличие антибактериальной активности гемодеривата по отношению к представителям рода стафилококков, в частности, эпидермального и золотистого, рода энтерококков и синегнойной палочки.

Приведенные данные свидетельствуют о том, что гемодериват получаемый путем ферментативного гидролиза эритро­массы, обладает антибактериальными свойствами. Это позволило предположить возможность создания наружного антибактериального лекарственного средства на его основе. Оценивали кожно-раздражающее действие раствора гемодеривата на модели морской свинке. В ходе исследований было принято решение использовать раствор гемодеривата в спирте этиловом 70% по объему ввиду лучшего распределения по сравнению с водным раствором по кожному покрову животных. Выявлено, что спиртовой раствор гемодеривата не вызывал покраснения, раздражения и других видимых изменений кожных покровов животных. Было отмечено, что после 10-го дня нанесения раствора

гемодеривата скорость роста ворса в местах аппликаций увеличивалась по сравнению с контролем (без нанесения раствора гемодеривата). Далее оценивали свойство стимуляции роста ворса морских свинок.

Для оценки ростостимулирующей активности использовали раствор гемодеривата 20 мг/мл по сухому веществу в спирте этиловом 70%. Была отмечена разница в скорости и характере роста волос по сравнению с контролем. Скорость роста ворсинок статистически достоверно отличалась после 14 дней аппликаций, достигая разницы в длине ворсинок до 3 мм. Наибольшая разница замечена после 24 дней аппликаций и составляла 6 мм. По истечении 31 дня был достигнут максимум длины ворса морских свинок текущего возраста (4 мес.) - около 18 мм. Таким образом, эффект спиртового раствора пептидного комплекса гемодеривата, выраженный в стимуляции скорости роста ворса, наступает после 14 дней ежедневных аппликаций. Кроме того, после 14 дней оценку длины ворсинок можно производить более адекватно.

Таким образом, было установлено, что гемодериват обладает рядом биологических свойств – антибактериальным действием по отношению к условно-патогенным микроорганизмам и стимулирующим рост ворса морских свинок свойством. Далее изучали биологическое действие гемодеривата как компонента питательной среды на выращивание представителя эукариотических клеток – перевиваемой клеточной линии почки эмбриона свиньи – SPEV. Питательный субстрат конструировали на основе коммерческой питательной среды 199 путем частичной замены ее объема раствором гемодеривата. Раствором-заменителем явился раствор гемодеривата с концентрацией сухих веществ 20 мг/мл. Главным показателем при оценке качества питательных сред явился ИП, который высчитывали в течение 5 пассажей.

При замене 15% питательной среды 199 раствором гемодеривата количество клеток соответствовало нормативному (количество снятых клеток более, чем в 4 раза превышает количество засеянных), превышало количество

клеток на контрольной питательной среде (100% среда 199), при этом нарастание адаптированных к измененной по составу среде клеток происходит более интенсивно и плотный монослой наблюдался уже после первых суток культивирования.

Таким образом, наилучшие ростовые качества показала экспериментальная среда с конечной концентрацией гемодеривата 3 мг/мл. Стабильность гемодеривата в процессе хранения (1 год) в сухом виде оценивали так же - по пролиферативной активности питательной среды на его основе по сравнению с контролем – средой 199. В качестве культуры клеток использовали SPEV. Индексы пролиферации клеток SPEV имели тенденцию незначительно снижаться при культивировании на экспериментальной среде, содержащей гемодериват со сроком хранения 12 месяцев в отличие сред, содержащих гемодериват меньшим сроком хранения. Таким образом, можно сделать вывод, что культивирование клеточных линий с целью быстрого наращивания биомассы целесообразно проводить на средах, содержащих гемодериват минимальным сроком хранения. В производственных условиях в целях выращивания и поддержания культуры можно рекомендовать к использованию экспериментальные среды, содержащие гемодериват с любой из исследованных продолжительностью хранения, поскольку значения ИП клеток на них выше, чем на контрольных.

В связи с этим, эффективность использования сред с гемодериватом будет обоснованной до тех пор, пока значения ИП клеток на них будут выше, чем на контрольной среде. Соответственно, допустимо использование питательных сред, содержащих гемодериват со сроком хранения 12 месяцев. Далее проведена оценка возможности контроля противовирусной активности препаратов ЧЛИ с использованием клеток SPEV, выращенных на питательной среде, содержащей гемодериват. Оценивали возможность использования клеточной линии SPEV, выращенной на экспериментальной питательной среде для определения противовирусной активности интерферона по сравнению с клеточной линией SPEV, выращенной на контрольной – среде 199.

Специфическую активность определяли на 6-и производственных сериях препарата интерферона. В результате опыта было выявлено, что исследуемые серии интерферона соответствуют требованиям ФСП ЛС – 001078-130711 по показателю специфической активности (см. прил. «Протокол определения специфической активности препарата «Интерферон человеческий лейкоцитарный интерферон альфа лиофилизат для приготовления раствора для интраназального введения и ингаляций 1000 МЕ» производства ФГУП «НПО «Микроген» Министерства здравоохранения Российской Федерации филиал в г. Пермь «Пермское НПО «Биомед» с использованием культуры клеток SPEV, культивируемой на питательной среде 199, изготовленной ФГУП «Предприятие по производству бактериальных и вирусных препаратов Института полиомиелита и вирусных энцефалитов им. М. П. Чумакова РАМН», а так же на экспериментальной полусинтетической питательной среде, содержащей гемодериват эритроцитной массы крови человека). Можно сделать вывод, что клетки SPEV, выращенные на питательной среде с гемодериватом и на контрольной среде 199, позволяют получать идентичные показатели при определении противовирусной активности интерферона с их использованием. Таким образом, разработанный состав экспериментальной полусинтетической среды, содержащей 85% среды 199 и 15% раствора гемодеривата, конечная концентрация которого в готовом субстрате составляла 3 мг/мл по сухому веществу, позволил культивировать клеточную линию SPEV с достижением значений ИП выше, чем на контрольной среде – 199. При этом полученные клетки можно использовать в технологии человеческого лейкоцитарного интерферона на стадии определения специфической активности готового препарата.

Таким образом, гемодериват, являющийся продуктом ферментативного гидролиза эритроцитной массы крови человека – это биологически активная пептидная субстанция, обладающая рядом свойств – от антибактериальных до пролиферативных. В данной диссертационной работе достигнута главная цель – разработана технология получения гемодеривата из отхода

биотехнологического производства – эритроциты крови человека и определены его биологические свойства. Так же предложен вариант использования полученной субстанции, в частности, в нуждах самого биотехнологического предприятия, производящего такой отход.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Антипова, Л. В. Продукт эмульсионной природы на основе растительного белка / Л. В. Антипова, В. М. Перелыгин, Е. Е. Курчаева // Хранение и переработка сельхозсырья. – 2001. – № 1. – С. 50-52.
2. Артюхин, В. И. Белковые гидролизаты в производстве питательных сред / В. И. Артюхин, А. П. Шепелин, Н. В. Киселева // Производство и применение продуктов микробиологических производств. – Москва : ВНИИСЭНТИ Минмедпрома СССР, 1990. – № 9 [9–10]. – С. 31-38.
3. Балдынова, Ф. П. Биотехнологический способ получения косметических средств / Ф. П. Балдынова // Вестн. Вост.-Сиб. гос. технол. ун-та. – 2010. – № 4. – С. 96-100.
4. Богрянцева, М. П. Технология изготовления и свойства питательной среды сухой стерильной на основе гидролизатов : дис. ... канд. биол. наук : 03.00.23 / Богрянцева Марина Поликарповна. – Кольцово, 1999. – 190 с.
5. Борисова, И. В. Получение и исследование иммуноглобулинов из отходов производства препаратов крови / И. В. Борисова, Н. А. Мухина // Препараты нормальных и специфических иммуноглобулинов человека : сб. науч. тр. – Москва, 1976. – Т. 18. – С. 69-75.
6. Борисова, И. В. Содержание иммуноглобулинов в сыворотках крови и в отходах производства γ -глобулина (в осадке Б) // Препараты нормальных и специфических иммуноглобулинов человека : сб. науч. тр. – Москва, 1976. – Т. 18. – С. 66-68.
7. Будихина, А. С. Дефензины - мультифункциональные катионные пептиды человека / А. С. Будихина, Б. В. Пинегин // Иммунопатология, аллергология, инфектология. – 2008. – №2. – С. 31-40.
8. Бургасова, П. Н. Руководство по вакцинному и сывороточному делу / П. Н. Бургасова. – Москва : Медицина, 1978. – 440 с.
9. Быкова, К. М. Пути использования белковых отходов гамма-глобулинового производства для получения биопрепаратов / К. М. Быкова, Н. И.

- Макаревич, Т. Н. Блищенко // Препараты крови : сб. науч. тр. / под ред. И. Н. Блохиной. – Горький, 1981. – С. 92-97.
10. Вирус 999-й пробы. В стране критическая ситуация с донорской кровью [Электронный ресурс] // Рос. газ. – 2004. – № 3508. – Режим доступа : <http://www.rg.ru/2004/06/23/donor.html> – (Дата обращения 29.05.2013).
 11. Витакер, А. Среды для культивирования клеток млекопитающих. Новые методы культуры животных тканей / А. Витакер ; под. ред. А. Фридлянского. – Москва, 1976. – С. 16-19.
 12. Влияние физических и химических методов на степень инаktivации вируса иммунодефицита человека / Н. В. Лазовская [и др.] // Мед. новости. – 2007. – № 13. – С. 7-11.
 13. Влияние экзогенных протеолитических ферментов на бактерии / В. В. Тец [и др.] // Антибиотики и химиотерапия. – 2004. – Т. 49, № 12. – С. 9-13.
 14. Воробьев, М. М. Кинетика ферментативного гидролиза полипептидов и гидрофобные эффекты : дис. д-ра хим. наук : 02.00.04 / Воробьев М. М. – Москва, 2009. – 273 с.
 15. Ворошилова, Н. Н. Научные основы и разработка технологий производства препаратов бактериофагов *Shigella* и *Klebsiella* : автореф. дис. ... д-ра мед. наук / Ворошилова Н. Н. – Москва. – 1992. – 53 с.
 16. Гигиена, токсикология, санитария. Микробиологическая и молекулярно-генетическая оценка воздействия наноматериалов на представителей микробиоценоза [Электронный ресурс] : 1.2.2634-10.1.2 : метод. указания : утв. 24.05.2010. – Режим доступа : <http://base.consultant.ru/cons/cgi/online.cgi?req=doc;base=EXP;n=491093>. – (Дата обращения : 20.05.2013).
 17. Гистология, цитология и эмбриология : учебник / Ю. И. Афанасьев [и др.] ; – Изд. 5-е, перераб., доп. – Москва : Медицина, 2002. – 744 с. – (Учебная литература для студентов медицинских вузов).

18. Голубев, Д. Б. Руководство по применению клеточных культур в вирусологии / Д. Б. Голубев, А. А. Сомина, М. Н. Медведева. – Ленинград : Медицина, 1976. – 222 с.
19. Громов, С. И. Оптимизация режимов ферментативного гидролиза сырья в производстве этанола при переработке различных видов зернового сырья с использованием фильтрата барды взамен воды / С. И. Громов и др. // Микробные биокатализаторы для перерабатывающих отраслей АПК. – Москва, 2006. – С. 138-140.
20. Децина, А. Н. Белковые гидролизаты в качестве основы питательных сред / А. Н. Децина, А. Г. Бачинский, В. И. Байбаков // Производство и применение продуктов микробиологических производств. – Москва : ВНИИСЭНТИ Минмедпрома СССР. – Москва, 1985. – 67 с.
21. Дьяконов, Л. П. Гидролизаты молочных мышечных и растительных белков как основы питательных сред для культивирования клеток и вирусов / Л. П. Дьяконов, Г. М. Строкина, А. Ф. Конюхов // Цитология. – 1994. – №36(6). – С. 522.
22. Жибурт, Е. Б. Пути повышения качества отечественных препаратов крови // Ремедиум. – 2005. – № 4. – С. 42-44.
23. Жибурт, Е. Б. Правила переливания плазмы : руководство для врачей / Е. Б. Жибурт. – Москва : Медицина, 2008. – 240 с.
24. Зубкова, Н. В. Методы инаktivации вирусов в технологии производства иммуноглобулиновых препаратов / Н. В. Зубкова, В. В. Анастасиев // Новое в трансфузиологии. Информационный бюллетень. – Москва, 2002. – № 33. – С. 52-59.
25. Иен, Н. Х. Получение гидролизата из пресноводного моллюска дрейссены / Н. Х. Иен, М. В. Новикова, А. К. Хамзина // Рыбпром. – 2007. – № 4. – С. 32-33.
26. Информация о предприятиях : [Электронный ресурс] // Микроген. – Режим доступа : <http://www.microgen.ru/production/> – (Дата обращения 20.05.2013).

27. Использование жидкой питательной среды из ферментативного гидролизата белков обезжиренного коровьего молока в технологии вакцины чумной живой сухой / А. А. Лещенко [и др.]. // Биопрепараты. – 2011. – №3 (43). – С. 53-56.
28. Кальницкая, О. И. Оценка качества и безопасности белкового гидролизата как основы для получения экструдированных продуктов / О. И. Кальницкая, Е. А. Карелина, Г. В. Семенов // Хранение и переработка сельхозсырья. – 2013. – № 1. – С. 38-40.
29. Кленова, Н. А. Изучение механизма образования пептидных соединений эритроцитами человека / Н. А. Кленова, Р. О. Кленов // 5-я Международная научно-практическая конф. «Фундаментальные и прикладные исследования в системе образования»: сб. науч. тр. – Тамбов, 2007. – С. 109-111.
30. Кленова, Н. А. Строение, метаболизм и функциональная активность эритроцитов человека в норме и патологии / Н. А. Кленова, Р. О. Кленов. – Самара : Самар. ун-т, 2009. – 116 с.
31. Коденев, А. Т. Скрининг маркеров инфекций у доноров крови / А. Т. Коденев, М. Н. Губанова, Е. Б. Жибурт // Вестник службы крови России. – 2010. – №2. – С. 13-16.
32. Конструирование бессывороточных питательных сред для культивирования клеток млекопитающих / А. А. Пригода [и др.] // Биотехнология. – 1990. – № 2. – С. 35.
33. Конструирование бессывороточных питательных сред для культивирования клеток млекопитающих / А. А. Пригода [и др.] // Биотехнология. – 1991. – № 5. – С. 55-59.
34. Коростелева, Н. И. Биотехнология : учеб. пособие / Н. И. Коростелева, Т. В. Громова, И. Г. Жукова. – Барнаул : изд-во АГАУ, 2006. – 127 с.
35. Кочетов, Г. А. Практическое руководство по энзимологии / Г. А. Кочетов. – Москва : Высш. шк., 1981. – 272 с.;

36. Краткая химическая энциклопедия : в 5 т. / под ред. И. Л. Клунянц. – Т. 3. – Москва, 1964. – [555 с.].
37. Крылов, И. А. Ферментативный гидролиз белковых веществ биомассы промышленных микроорганизмов / И. А. Крылов, А. А. Красноштанова, М. Н. Манаков // Биотехнология, 1998. – № 6. – С. 84-89.
38. Кулагина, К. А. Морские свинки. Наши питомцы / К. А. Кулагина. – Москва : Вече, 2008. – 240 с. : ил.
39. Куликова, И. Л. Культура клеток сосудов теленка и чувствительность клеток этой культуры к вирусу диареи крупного рогатого скота / И. Л. Куликова, Л. П. Дьяконов, С. А. Жидков // Цитология. – 1992. – № 34(9). – С. 75.
40. Лабораторные методы исследований в клинике : справочник / В. В. Меньшиков [и др.] ; под ред. В. В. Меньшикова – Москва : Медицина, 1987. – 368 с. ; ил.
41. Либерман, С. Г. Переработка крови убойных животных на мясокомбинатах : учеб. пособие для кадров массовых профессий / С. Г. Либерман, Л. С. Пожаринская, М. Л. Файвишевский. – Москва, 1980. – 200 с. – (Пищевая промышленность).
42. Максимова, Е. М. Разработка технологии утилизации белковых отходов методом ферментативного гидролиза / Е. М. Максимова // Вестн. МГТУ. – 2006. – Т. 9, № 5. – С. 875-879.
43. Максимюк, Н. Н. О преимуществах ферментативного способа получения белковых гидролизатов / Н. Н. Максимюк, Ю. В. Марьяновская // Фундам. исслед. – 2009. – № 1 – С. 34-35.
44. Малкова, Н. В. β -эндорфинподобный пептид иммунорфин: свойства и механизм действия : дис. ... канд. биол. наук : 03.00.03 / Малкова Наталья Владимировна. – Москва, 2002. – 121 с.
45. Мац, А. Н. Аффинолейкин биофармацевтический препарат для инструктивной противoinфекционной иммунотерапии при

- недостаточности клеточного иммунитета / А. Н. Мац, Н. П. Перепечкина // Микробиол. журн. – 1998. – № 2. – С. 78-83.
46. Мац, А. Н. Трансфер-фактор это N-концевая часть «протомера» растворимого Т-клеточного антигенсвязывающего белка // Аллергология и иммунология. – 2005. – Т. 6, № 2. – С. 140-143.
47. Машковский, М. Д. Лекарственные средства : справочник / М. Д. Машковский. – 14-е изд., перераб., испр. и доп. – Москва : Новая волна, 2002. – 608 с.
48. Меджидов, М. М. Состояние и перспективы развития производства отечественных питательных сред / М. М. Меджидов, Ш. М. Меджидов, С. М. Омарова // Материалы V съезда Общества биотехнологов России им. Ю. А. Овчинникова. – Москва, 2008. – С. 277-278.
49. Методические рекомендации по диагностике, терапии и профилактике нарушений обмена веществ у продуктивных животных [Электронный ресурс] : метод. рекомендации : утв. 8 июля 2005 г [протокол № 2]. – Режим доступа : <http://base.consultant.ru/cons/cgi/online.cgi?req=doc;base=EXP;n=561219>. – (Дата обращения : 10.05.2013)
50. Методы контроля бактериологических питательных сред [Электронный ресурс] : метод. указания : 4.2.2316-08 : утв. 18.01.2008 : – Режим доступа : <http://base.consultant.ru/cons/cgi/online.cgi?req=doc;base=EXP;n=438594>.
51. Методы контроля. Биологические и микробиологические факторы. Система предрегистрационного доклинического изучения безопасности препаратов. Отбор, проверка и хранение производственных штаммов, используемых при производстве пробиотиков [Электронный ресурс] : метод. указания : 4.2.2602-10.4.2 : утв. 21.04.2010. – Режим доступа : <http://base.consultant.ru/cons/cgi/online.cgi?req=doc;base=EXP;n=491450>.
52. Назаренко, Г. И. Клиническая оценка результатов лабораторных исследований / Г. И. Назаренко, А. А. Кишкун. – Москва, 2000. – С. 19-21.
53. Никифоров, А. К. Новые питательные среды для культивирования возбудителей чумы и холеры / А. К. Никифоров, М. В. Антонычева, И. М.

- Жулидов // Итоги и перспективы обеспечения эпидемиологического благополучия населения РФ : материалы X съезда Всерос. науч.-практ. о-ва эпидемиологов, микробиологов и паразитологов // Инфекция и иммунитет. – 2012. – Т. 2, № 1, 2. – С. 306.
54. Определение кинетических констант гидролиза кератинсодержащего сырья / А. Д. Неклюдов [и др.] // Прикладная биохимия и микробиология. – 1999. – Т. 35, № 1. – С. 45-49.
55. Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам [Электронный ресурс] : метод. указания : 4.2.1890-04 : утв. 04.03.2004. – Режим доступа : <http://www.consultant.ru/search/?x=9&y=6&q=%CC%D3%CA+4.2.1890-04&where=main>. – (Дата обращения : 20.05.2013).
56. Основы биохимии : в 3 т : пер. с англ. Т. 2 / А. Уайт [и др.]. – Москва : Мир, 1981. – 619 с.
57. Оценка алергизирующих свойств фармакологических средств [Электронный ресурс] : метод. рекомендации : № 98/300 : утв. 11.06.1998. – Режим доступа : http://hippocratic.ru/medtext1/medtext_5630.htm. – (Дата обращения : 20.05.2013).
58. Панов, В. П. Принципы обеспечения вирусной безопасности продуктов крови (обзор) // Хим.-фарм. журн. – 38 (3). – 2004. – С. 39-47.
59. Пат. 121911 СССР, МПК А61К35/14. Способ получения из цельной крови крупного рогатого скота белкового гидролизата для парэнтерального питания "аминокровин" / З. А. Чаплыгина, В. А. Юрьев ; патентообладатель З. А. Чаплыгина, В. А. Юрьев – № 576702 ; заявл. 23.08.1954 ; опубл. 01.01.1959, Бюл. № 16 – 2 с.
60. Пат. 2020153 Рос. Федерация, МПК С12N5/00, С12P21/06. Способ получения ферментативного гидролизата и ПС для культивирования клеток эукариотов : / Искандеров Р.И. [и др.] ; патентообладатель науч.-произв. центр мед. биотехнологии. – № 4918806/13 ; заявл. 17.01.1991 ; опубл. 30.09.1994, Бюл. № 18. – 6 с.

61. Пат. 2055482 Рос. Федерация, МКИ 6 А 23 J 3/04, 3/00, 3/34, А 61 К 35/60. Способ получения белково-нуклеинового гидролизата : / Гафуров Ю. М. [и др.] ; заявитель и патентообладатель Тихоокеан. ин-т биоорган. химии Рос. акад. наук. – № 94017640/13 ; заявл. 13.05.94 ; опубл. 10.03.96, Бюл. № 7. – 4 с.
62. Пат. 2068879 Рос. Федерация, МПК С12N1/00, С12N1/20, С12N5/00. Способ получения ферментативного гидролизата и питательная среда "Эпидермат-2" для культивирования клеток эукариотов / Ермишина И. Г., Майнерт А. Г., Власова Т. Ф. ; патентообладатель Ермишина И. Г. – № 92014119/13 ; заявл. 24.12.1992 ; опубл. 10.11.1996, Бюл. № 31. – 5 с.
63. Пат. 2074249 Рос. Федерация, МПК С12N1/00, С12N1/20, С12N5/00. Способ получения ферментативного гидролизата из мышечной ткани ластоногих и питательная среда "Целат" для культивирования клеток эукариотов / Ермишина И. Г., Майнерт А. Г., Власова Т. Ф. ; патентообладатель Кобзарь А. П. – № 92006882/13 ; заявл. 18.11.1992 ; опубл. 27.02.1997. – 4 с. Патенты поднять на букву П и расположить в прямой хронологии номеров
64. Пат. 2084172 Рос. Федерация : МПК А23J3/00, А23J3/34. Способ получения гидролизата белка молочной сыворотки / Пер Мюнк Нильсен, Свенн Эриксен, Оле Регнар Хансен ; патентообладатель Данмарк Протеин А/С – № 93058581/13 ; заявл. 27.05.1992 ; опубл. 20.07.1997. – 6 с.
65. Пат. 2101357 Рос. Федерация, МПК С12Q1/04, С12N1/20. Питательная среда для выделения и культивирования коклюшного микроба / Л. Н. Алексеева [и др.] ; заявитель и патентообладатель Гос. федер. предприятие «Государственный научный центр прикладной микробиологии». – № 95119951/13 ; заявл. 23.11.1995 ; опубл. 10.01.1998.
66. Пат. 2133097 Рос. Федерация, МПК А23К1/10. Способ получения кормовой добавки «Витапептид» / Л. Я. Телишевская, С. С. Демидович, З. Ф. Богаутдинов ; патентообладатель ЗАО "Фермент плюс". – № 97118240/13 ; заявл. 12.11.1997 ; опубл. 20.07.1999. – 4 с.

67. Пат. 2187801 Рос. Федерация, МПК G01N33/15, A61K35/74. Способ определения антагонистической активности пробиотиков / В. А. Несчисляев [и др.] ; заявитель и патентообладатель Перм. науч.-произв. об-ние "Биомед". – № 2000118391/14 ; заявл. 10.07.00 ; опубл. 20.08.2002, бюл. № 23.
68. Пат. 2425866 Российская Федерация, МПК C12N1/20; C12R1/63. Питательная среда для глубинного культивирования холерного вибриона / М. В. Антонычева [и др.] ; заявитель и патентообладатель Рос. науч.-исслед. противочумный ин-т «Микроб» – № 2010121691/10 ; заявл. 27.05.2010 ; опубл. 10.08.2011, Бюл. № 22. – Перед загл. авт. : С. А. Нижегородцев, С. А. Ерёмин, Т. В. Алёнкина, И. В. Шульгина, Н. И. Вахрушина, А. Д. Белоусов, И. М. Жулидов, А. К. Никифоров.
69. Перспективы использования отходов производства препаратов крови на Пермском НПО «Биомед» : сб. тез. / Л. В. Волкова [и др.] // Вестн. Перм. гос. тех. ун-та. Химическая технология и биотехнология. – 2007. – № 7 (1). – С. 28-31.
70. Питательная среда для выращивания культур клеток животных : авт. свид. 1025722 СССР / Панкова Г.Е. [и др.] ; опубл. 1983, бюл. № 24.
71. Питательные среды на основе солянокислого гидролизата куриных эмбрионов для культивирования клеток животных. Отработка режима очистки гидролизатов и состава питательной среды / И. В. Иванов [и др.] // Биотехнология. – 1991. – № 5. – С. 59-62.
72. Поезжалова, Г. Н. Изготовление сред для культур клеток на основе отечественных гидролизатов и изучение их биологических свойств : тез. докл. / Г. Н. Поезжалова // Всесоюзная конференция "Актуальные вопросы разработки препаратов медицинской биотехнологии". – Махачкала, 1998. – №2. – С. 46.
73. Получение белковой основы для питательных сред из субпродукта молочной промышленности / К. Родригес Мартинес [и др.] // Журн. микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. – 1993. – № 1. – С. 3-7.

74. Получение сухого гидролизата фибрина и применение его в качестве основы для изготовления питательных сред / И. М. Жулидов [и др.] // Современные технологии обеспечения биологической безопасности : материалы III науч.-практ. школы-конф. молодых ученых и специалистов науч.-исслед. организаций Роспотребнадзора. – Оболенск, 2011. – С. 261-263.
75. Польшгалына, Г. В. Определение активности ферментов : справочник / Г. В. Польшгалына, В. С. Чередниченко, Л. В. Римарева. – Москва : ДеЛи Принт, 2003. – 372 с.
76. Пробиотики: сравнительная характеристика моно- и поликомпонентных препаратов / В. А. Несчисляев, [и др.] // Сиб. мед. журн. – 2011. – Т. 26, № 2 (2). – С. 68-70.
77. Профилактика инфекционных заболеваний. Инфекции дыхательных путей. Эпидемиологический надзор за коклюшной инфекцией [Электронный ресурс] : метод. указания : 3.1.2.2160-07 : утв. 12.02.2007. – Режим доступа : <http://base.consultant.ru/cons/cgi/online.cgi?req=doc;base=EXP;n=391467>. – (Дата обращения : 20.04.2013).
78. Разработка питательных сред на основе аминокислот для культивирования листерий / Л. А. Коротева [и др.] // Научные основы технологии промышленного производства ветеринарных биологических препаратов : тез. докл. – Щелково, 1996. – С. 123.
79. Раскин, Б. М. Использование гидролизатов крови животных в качестве питательной основы микробиологических сред : тез. докл. / Б. М. Раскин, В. А. Мельникова, С. В. Денисова // XVI Всесоюзный съезд микробиологов и эпидемиологов. – Москва, 1977. – Ч. 1. – С. 310-311.
80. Родичева, Э. К. Билюминесцентные биотесты на основе светящихся бактерий для экологического мониторинга / Э. К. Родичева, А. М. Кузнецов, С. Е. Медведев // Вестн. ОГУ Рос. акад. наук. – 2004. – № 5. – С. 96-100.

81. Румянцев, А. Г. Основные свойства внутривенных иммуноглобулинов и показания к их применению // Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии. – 2011. – №10(2). – С. 39-50.
82. Салтанов, А. И. Современные требования к растворам аминокислот для парентерального питания в онкологии // Интенсивная терапия. – 2003. – № 5. – С. 6-22.
83. Сидоркевич, С. В. К вопросу о совершенствовании организации работы станций переливания крови / С. В. Сидоркевич, С. П. Калеко, Е. Б. Жибурт // Трансфузиология. – 2000. – № 1. – С. 28-46.
84. Синтез и свойства миелопептидов с дифференцировочной активностью / Л. А. Фолина [и др.] // Биоорганич. химия. – 2010. – Т. 36, №4. – С. 493-497
85. Станции переливания крови : [Электронный ресурс] // Бизнес-карта России. – Режим доступа : http://mxkr.ru/ru/stantsii_perelivaniya_krovi. – (Дата обращения 24.04.2013).
86. Теоретические и практические основы технологии сублимационного высушивания биопрепаратов / А. А. Нежута [и др.]. – Курск, 2002. – 211 с.
87. Траубенберг, С. Е. Ферментативный гидролиз как инструмент для повышения пищевой ценности продуктов растениеводства / С. Е. Траубенберг, Е. В. Милорадова // Хранение и переработка сельхозсырья. – 2007. – № 5. – С. 62-65.
88. Трофимов, А. Н. Получение углеводно-белкового корма на основе соломы / А. Н. Трофимов, А. М. Белоусов // Химия растит. сырья. – 2003. – № 4. – С. 69-72.
89. ТУ 10-09-137-91. Ферментативный гидролизат белков крови сухой. – Введ. 1991. – Москва, 1991.
90. ТУ 46-12-20-80. Ферментативный гидролизат мышечных белков сухой. – Введ. 1980–09–20. – Москва, 1980.
91. Тутельян, В. А. Физиологическая роль коротких пептидов в питании / В. А. Тутельян, В. Х. Хавинсон, В. В. Малинин // Бюл. эксперим. биологии и медицины. – 2003. – Т. 135, № 1. – С. 4-10.

92. Фрагменты функциональных белков в переживающей культуре эритроцитов человека / М. М. Филиппова [и др.] // Биоорганич. химия. – 2008. – Т.34, № 2. – С. 160-170.
93. ФС 42-3433-97. Интерферон лейкоцитарный человеческий сухой.– Санкт-Петербург, 1997. – 11 с. – (Дата введения : 02.1998).
94. ФС 42-94ВС-88. Питательная среда 199 стерильная, жидкая.– Пермь, 1988. – 16 с. – (Дата введения : 1988).
95. Ценева, Г. Я. Микробиологическая характеристика возбудителя коклюша и лабораторная диагностика коклюша / Г. Я. Ценева, Н. Н. Курова // Клинич. микробиология и антимикробная химиотерапия. – 2003. – Т. 5, № 4. – С. 329-341.
96. Ченцов, Ю. С. Введение в клеточную биологию / Ю. С. Ченцов. – 4-е изд., перераб. и доп. – Москва : Академкнига, 2004. – 495 с.
97. Щеглова, И. В. Пути повышения пищевой ценности грибов // Ползуновский вестн. – 2008. – № 1 [2]. – С. 24-27.
98. Энтелис Н.С. Аминоацил-тРНК-синтетазы: два класса ферментов // Соросовский образоват. журн. – 1998. – № 9. – С. 14-21.
99. Эффективность методов тепловой инактивации в производстве внутривенного иммуноглобулина / Мазепа В. Н. [и др.] // Вестн. службы крови России. – 2002. – № 1. – С. 31-33.
100. Aggregation of protein-coated colloidal particles: Interaction energy, cluster morphology, and aggregation kinetics / M. Tirado-Miranda [et al.] // J. Chem. Phys. 2003. – Vol. 119, № 17. – P. 9251-9259.
101. Benjakul, S. Protein hydrolysates from pacific writing solid wastes / S. Benjakul, M. Morrissey // Agr. Food Chem. – 1997. – № 45 (9). – P. 3425-3430.
102. Bi-objective optimisation of the enzymatic hydrolysis of porcine blood protein / R. Pérez-Gálvez [et al.] // Biochemical Engineering Journal. – 2011. – vol. 53. – № 3. – P. 305-310.

103. Caplan, A. I. Mesenchymal stem cells: building blocks for molecular medicine in the 21st century / A. I. Caplan, S. P. Bruder // *Trends Mol. Med.* – 2001. – Vol. 7, № 6. – P. 259-264.
104. Caplan, A. I. Mesenchymal stem cells as trophic mediators / A. I. Caplan, J. E. Dennis // *Cell Biochem.* – 2006. – Vol. 98, № 5. – P. 1076-1084.
105. Chrysina, E. D. Crystal structures of apo- and holo-bovine α -lactalbumin at 2.2 Å resolution reveal an effect of calcium on inter-lobe interactions / E. D. Chrysina, K. Brew, K. R. Acharya // *J. Biol. Chem.* – 2000. – Vol. 275, № 47. – P. 37021-37029.
106. Duarte, R. T. Bovine blood components: fractionation, composition, and nutritive value / R. T. Duarte, M. C. Carvalho Simões, V. C. Sgarbieri // *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* – 1999. – vol. 47. – № 1. – P. 231-236.
107. Gel filtration principles and methods : [Электронный ресурс] // методологическое руководство. – Режим доступа : <http://ru.scribd.com/doc/94944048/Gel-Filtration-Principles-and-Methods> (дата обращения 12.03.2012)
108. Guerard, F. Production of tuna waste hydrolysates by a commercial neutral protease preparation / F. Guerard, L. Guimas, A. Binet // *Journal of Molecular Catalysis B.* – 2002. – vol. 19-20. – P. 489-498.
109. Hydrolysis of rapeseed protein isolates: Kinetics, characterization and functional properties of hydrolysates / G. Chabanon [et al.] // *Proc. Biochem.* 2007. – Vol. 42. – № 10. – P. 1419–1428.
110. Ipsen, R. Molecular self-assembly of partially hydrolysed α -lactalbumin resulting in strong gels with a novel microstructure / R. Ipsen, J. Otte, K. B. Qvist // *J. Dairy Res.* – 2001. – Vol. 68. – P. 277-286.
111. Ivanov, V. T. Hemoglobin as a source of endogenous bioactive peptides: the concept of tissue-specific peptide pool / V. T. Ivanov, A. A. Karelin, M. M. Philippova // *Biopolimers (peptide Sci).* – 1997. – Vol. 43, № 2. – P. 171-188.

112. Jen-Ting, W. Bioactive peptide production by hydrolysis of porcine blood proteins in a continuous enzymatic membrane reactor» / W. Jen-Ting, C. Been-Huang // *Sci Food Agric.* – 2009. – № 89. – P. 372-378.
113. Kinetics of β -casein hydrolysis by wild-type and engineered trypsin / M. M. Vorob'ev [et al.] // *Biopolymers.* – 2000. – № 54. – P. 355-364.
114. Korpela, M. T. A recombinant *Escherichia coli* sensor strain for the detection of tetracyclines / M. T. Korpela // *Anal. Chem.* – 1998. – № 70 (21). – P. 4457-4462.
115. Kurittu, J. Detection of tetracyclines with luminescent bacterial strains / J. Kurittu, M. Karp, M. Korpela // *Luminescence.* – 2000. – № 15. – P. 291-297.
116. Luminescent method for the detection of antibacterial activities / L. Simon [et al.] // *Appl. Microbiologic. Biotechnology.* – 2001. – № 57. – P. 757-763.
117. Melnik, I. L. Polymelitis viruses in tissue culture in protein free nutrient media in stationary and roller tube cultures / I. L. Melnik, A. Riordan // *Proc. Exp. Biol. Med.* – 1952. – № 1. – P. 208-213.
118. Novel opioid peptides derived from hemoglobin: hemorphins / V. Brantl [et al.] // *Eur. J. Pharmacol.* – 1986. – Vol. 125. – P. 309-310.
119. Optimisation of the enzymatic hydrolysis of blood cells with a neutral protease / Yanbin Zheng [et al.] // *BioMed Research International.* – 2013. – Article ID 278927. – P. 1-10.
120. Peptidomics: a logical sequel to proteomics / V. T. Ivanov [et al.] // *Expert Rev. Proteomics.* – 2005. – № 2. – P. 463-473.
121. Protein measurement with the folin phenol reagent / O. H. Lowry [et al.] // *Journ. Biol. Chem.* – 1951. – Vol. 193. – P. 265-275.
122. Proteolytic degradation of hemoglobin by endogenous lysosomal proteases gives rise to bioactive peptides: hemorphins / I. Fruitier // *FEBS Lett.* – 1999. – Vol. 447. – P. 81-86.
123. Purification and properties of a bacteriolytic enzyme from a soil amoeba *Hartmanella glebae* / J. C. Chung [et al.] // *Arch. Biochem. Biophys.* – 1969. – Vol. 135. – P. 244-252.

124. Search Sigma-Aldrich Documents and Web Content by Keyword : pepsin ; trypsin [Electronic resource]. – Режим доступа : <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/AdvancedSearchPage.do>. – (Дата обращения: 20.05.2013).
125. Self-assembled cationic peptide nanoparticles as an efficient antimicrobial agent / L. Liu // *Nature Nanotechnology*. – № 4. – 2009. – P. 457-463.
126. Stachowicz, K. J. Enzymic hydrolysis of Ox-Blood Hemoglobin / K. J. Stachowicz, C. E. Eriksson, S. Tjelle // *Enzymes in Food and Beverage Processing*. – 1997. – № 37. – P. 295-303.
127. Tenhami, M. Measurement of effects of antibiotics in bioluminescent *Staphylococcus aureus* RN4220 / M. Tenhami, K. Hakkila, K. Karp // *Antimicrob Agents and Chemother.* – 2001. – № 45. – P. 3456-3461.
128. Teschemacher, H. Opioid receptor ligands derived from food proteins // *Cur. Pharmaceutical Design*. – 2003. – Vol. 9, № 16. – P. 1331-1344.
129. The separation of the antibodies, isoagglutinins, prothrombin, plasminogen and 1-lipoprotein into subfractions of human plasma / J. L. Oncley [et al.] // *J. Amer. Chem. Soc.* – 1949. – Vol. 71. – P. 541-550.
130. The use of peptones as medium additives for the production of a recombinant therapeutic protein in high density perfusion cultures of mammalian cells / R. Heidemann [et. al] // *Cytotechnology*. – 2000. – № 32. – P. 157-167.
131. Vaintraub, A. Applying the increase in rate constants of cooperative proteolysis to the determination of transition curves of protein denaturation / A. Vaintraub, D. Morari // *J. Biochem. Biophys. Methods*. – 2003. – Vol. 5, № 3. – P. 191-201.
132. What makes a protein protein? Hydrophobic core designs that specify stability and structural properties / M. Munson [et al.] // *Protein Sci.* – 1996. – Vol. 5, № 8. – P. 1584-1593.
133. Wu, L. C. A specific hydrophobic core in the α -lactalbumin molten globule / L. C. Wu, P. S. Kim // *J. Mol. Biol.* – 1998. – Vol. 280. – № 1. – P. 175-182.

134. Yount, N. Y. Perspectives in Antimicrobial. Peptide Mechanisms of Action and Resistance : Immunoconsiluum / N. Y. Yount, M. R. Yeaman // Protein and Peptide Letters. – № 12(1). – 2005. – P. 49-67.

СПИСОК ИЛЛЮСТРАЦИЙ

№	Наименование	Стр.
1	Рис. 1. Схема расположения зон нанесения препарата и контроля на кожном покрове морской свинки	46
2	Таблица 1. Физико-химический анализ отхода технологии ЧЛИ – эритромаcсы человеческой крови	50
3	Таблица 2. Сравнительная оценка показателей аминного азота исходного сырья и опытных серий ферментативных гидролизатов эритромаcсы	56
4	Рис. 2. Содержание аминного азота в опытных сериях гидролизата с использованием различных ферментов.	56
5	Таблица 3. Сравнительная оценка физико-химических показателей исходной и гемолизированной эритромаcсы	58
6	Таблица 4. Сравнительная оценка физико-химических показателей исходной и выдержанной на водяной бане эритромаcсы	60
7	Рис. 3 Зависимость концентрации аминного азота от времени выдерживания подкисленной эритромаcсы на водяной бане	61
8	Таблица 5. Физико-химическая характеристика рабочего раствора эритромаcсы, предназначенного для гидролиза	62
9	Рис. 4 Схема приготовления растворов фермент-субстратной смеси	63
10	Таблица 6. Физико-химическая характеристика ферментативных гидролизатов эритромаcсы	63
11	Таблица 7. Физико-химическая характеристика образцов контрольного опыта	65
12	Таблица 8. Данные математического расчета содержания аминного азота в гидролизате эритромаcсе	66
13	Рис. 5 Зависимость количества аминного азота, выделяемого собственно эритромаcсой, от продолжительности гидролиза и концентрации фермента	67
14	Таблица 9. Зависимость интенсивности осветления гидролизата от исходной концентрации перекиси водорода	69
15	Таблица 10. Оптимальные параметры процесса гидролиза эритромаcсы	70
16	Рис. 6 Технологическая схема получения гемодеривата	72
17	Таблица 11. Физико-химическая характеристика гемодеривата эритромаcсы крови человека	74
18	Рис. 7 Хроматограмма гемодеривата	75
19	Таблица 12. Расчетные данные хроматограммы гемодеривата	75
20	Рис. 8 Молекулярная масса и концентрация веществ, идентифицированных в составе гемодеривата	76

21	Рис. 9 Хроматограмма раствора метилцеллюлозы 1% в физрастворе	77
22	Рис. 10 Хроматограмма раствора 1% метилцеллюлозы в растворе 0,0001М хлористоводородной кислоты	78
23	Таблица 13. Расчетные данные анализа хроматограмм раствора метилцеллюлозы	79
24	Таблица 14. Исследование стабильности физико-химических показателей гемодеривата в зависимости от срока хранения в лиофилизированном виде	80
25	Таблица 15. Содержание и заряд аминокислот, идентифицированных в составе гемодеривата	84
26	Рис. 11 Зависимость значения ИПБ от времени экспозиции и разведения раствора гемодеривата № 1 (40 мг/мл, рН от 6,8 до 7,4)	87
27	Рис. 12 Зависимость значения ИПБ от времени экспозиции и разведения раствора гемодеривата №2 (20 мг/мл, рН от 5,5 до 6,0)	88
28	Рис. 13 Зависимость значения ИПБ от времени экспозиции и разведения раствора гемодеривата № 3 (20 мг/мл, рН от 6,8 до 7,4)	89
29	Таблица 16. Оценка антибактериальной активности раствора гемодеривата № 3	91
30	Таблица 17. Анализ влияния раствора гемодеривата на скорость роста ворса морской свинки в зависимости от времени.	93
31	Рис. 14 Влияние накожных спиртовых аппликаций гемодеривата на скорость роста ворса морских свинок	94
32	Таблица 18. Содержание аминокислот в среде 199 и растворе гемодеривата (20 мг/мл)	97
33	Таблица 19. Некоторые свойства аминокислот в эукариотических клетках, входящих в состав среде 199 и раствора гемодеривата	99
34	Таблица 20. Физико-химические показатели варианта экспериментальной питательной среды № 1	103
35	Таблица 21. Физико-химические показатели варианта экспериментальной питательной среды № 2	104
36	Таблица 22. Физико-химические показатели состава экспериментальной питательной среды № 3	105
37	Таблица 23. Характеристика ростовых свойств питательных сред, содержащих раствор гемодеривата	107
38	Рис. 15 Сравнительный анализ значений ИП контрольной и экспериментальной среды, содержащей гемодериват	108
39	Таблица 24. Исследование стабильности пролиферативных свойств экспериментальной питательной среды, содержащей гемодериват, в зависимости от срока его хранения в сухом виде	110
40	Рис. 16 Сравнительный анализ значений ИП контрольной и	111

	экспериментальной среды, содержащей гемодериват со сроком хранения 4 мес	
41	Рис. 17 Сравнительный анализ значений ИП контрольной и экспериментальной среды, содержащей гемодериват со сроком хранения 12 мес	112
42	Рис. 18 Сравнительный анализ значений ИП экспериментальной сред, содержащих гемодериват с разными сроками хранения, по сравнению с контролем	113
43	Таблица 25. Оценка противовирусной активности интерферона с использованием клеточной линии SPEV, выращенной на среде с гемодериватом № 3 и на контрольной – среде 199	115

ПРИЛОЖЕНИЯ

ФГУП НПО «Микроген» Минздрава России филиал в г. Пермь
«Пермское НПО «Биомед»

Протокол от 23.05.2013 г.

**Определение специфической активности препарата
«Интерферон человеческий лейкоцитарный Интерферон альфа
лиофилизат для приготовления раствора для интраназального введения и ингаляций
1000 МЕ» производства ФГУП «НПО «Микроген» Минздрава России филиал в
г. Пермь «Пермское НПО «Биомед»**

Серии №: П 700, П 759, П 761, П762, П763, П764

Культура клеток: SPEV, культивируемая на «питательной среде 199», изготовленной ФГУП «Предприятие по производству бактериальных и вирусных препаратов Института полиомиелита и вирусных энцефалитов им. М.П. Чумакова РАМН».

Концентрация: клеток/мл 300 000

Дата посадки клеток: 20.05.2013 г.

Дата титрования интерферона: 21.05.2013 г.

Определение дозы вируса VSV: 22.05.2013 г.

Доза внесенного вируса: 10^{-4}

Внесение дозы вируса: 22.05.2013 г.

Учет результатов титрования интерферона: 23.05.2013 г.

Титр интерферона вычисляют методом Спирмена-Кербера по формуле:

$$\log_2 ED_{50} = D_{max} + d/n \times (p - n/2)$$

где D_{max} - \log_2 разведения, выше которого произошла 100% защита (-)

d - \log_2 интервала между разведениями (1.0)

n - число лунок на каждую дозу (4)

p - число лунок, давших защиту (-) в D_{max} и последующих разведениях

Противовирусную активность интерферона в МЕ вычисляют по формуле:

$$A_x = A_{СТ} / a_{СТ} \times a_x$$

A_x - противовирусная активность исследуемого образца интерферона в МЕ/амп.

$A_{СТ}$ - противовирусная активность Международного стандарта интерферона в МЕ/амп.

$a_{СТ}$ - титр Международного стандарта в данном опыте

a_x - титр исследуемого образца

КК- контроль культуры клеток

Определение титра вируса VSV:					Определение внесенной дозы вируса VSV				
Разведение вируса	Цитопатическое действие				Разведение	0	-1	-2	-3
-1	++++	++++	++++	++++	дозы вируса в lg				
-2	++++	++++	++++	++++	Цитопатическое действие	++++	+++	+	-
-3	++++	++++	++++	++++		+++	++	+	-
-4	+++	+++	++++	++++		++++	+++	+	-
-5	++	++	+++	+++		+++	+++	-	-
-6	++	-	-	++		доза внесенного вируса – 100 ТЦД ₅₀ /0,1 мл			
-7	-	-	-	-					
КК	-	-	-	-					

**Титрование Международного стандарта ВОЗ
Интерферон альфа, (человеческий лейкоцитарный)
NIBSC код: 94/784, 11000 ME/амп.:**

Разведение препарата	Цитопатическое действие			
100	-	-	-	-
200	-	-	-	-
400	-	-	-	-
800	-	-	-	-
1600	+	+	+	+
3200	+	+	+	+
КК	-	-	-	-

Результат: Титр $2^{10,14} = 1128,3$

$A_{Ст}/a_{Ст} = 11000/1128,3 = 9,75$

Коэффициент = 9,75

**Титрование препарата «Интерферон человеческий лейкоцитарный»
серия П 700**

Разведение препарата	Цитопатическое действие			
50	-	-	-	-
100	-	-	-	-
200	-	-	+	+
400	+	+	+	+
800	+	+	+	+
1600	+	+	+	+
КК	-	-	-	-

Результат: Титр $2^{7,64} = 199,47$

$A_x = 199,47 \times 9,75 = 1944 \text{ ME/амп.}$

**Титрование препарата «Интерферон человеческий лейкоцитарный»
серия П 759**

Разведение препарата	Цитопатическое действие			
50	-	-	-	-
100	-	-	-	-
200	-	-	+	+
400	+	+	+	+
800	+	+	+	+
1600	+	+	+	+
КК	-	-	-	-

Результат: Титр $2^{7,64} = 199,47$

$A_x = 199,47 \times 9,75 = 1944 \text{ ME/амп.}$

**Титрование препарата «Интерферон человеческий лейкоцитарный»
серия П 761**

Разведение препарата	Цитопатическое действие			
50	-	-	-	-
100	-	-	-	-
200	+	-	-	+
400	+	+	+	+
800	+	+	+	+
1600	+	+	+	+
КК	-	-	-	-

Результат: Титр $2^{7,64} = 199,47$
 $A_x = 199,47 \times 9,75 = 1944 \text{ МЕ/амп.}$

**Титрование препарата «Интерферон человеческий лейкоцитарный»
серия П 762**

Разведение препарата	Цитопатическое действие			
50	-	-	-	-
100	-	-	-	-
200	-	-	+	+
400	+	+	+	+
800	+	+	+	+
1600	+	+	+	+
КК	-	-	-	-

Результат: Титр $2^{7,64} = 199,47$
 $A_x = 199,47 \times 9,75 = 1944 \text{ МЕ/амп.}$

**Титрование препарата «Интерферон человеческий лейкоцитарный»
серия П 763**

Разведение препарата	Цитопатическое действие			
50	-	-	-	-
100	-	-	-	-
200	+	+	-	-
400	+	+	+	+
800	+	+	+	+
1600	+	+	+	+
КК	-	-	-	-

Результат: Титр $2^{7,64} = 199,47$
 $A_x = 199,47 \times 9,75 = 1944 \text{ МЕ/амп.}$


**Титрование препарата «Интерферон человеческий лейкоцитарный»
серия И 764**

Разведение препарата	Цитопатическое действие			
50	-	-	-	-
100	-	-	-	-
200	-	+	-	+
400	+	+	+	+
800	+	+	+	+
1600	+	+	+	+
КК	-	-	-	-

Результат: Титр $2^{7,64} = 199,47$
 $A_x = 199,47 \times 9,75 = 1944$ МЕ/амп.

Заключение: серии П 700, П 759, П 761, П 762, П 763, П 764 соответствуют
 требованиям ФСП ЛС-001078-130711 по показателю «специфическая активность».

Начальник отделения интерферона
 ФГУП НПО «Микроген»
 Филиал «Пермское НПО «Биомед»
 кандидат медицинских наук

 Е.Н. Перевозчикова

Микробиолог отделения интерферона
 ФГУП НПО «Микроген»
 Филиал «Пермское НПО «Биомед»

 Л.Б. Гужева

*Подписи Перевозчиковой Е.Н., Гужевой Л.Б.
 удостоверяю.
 Начальник отдела Макурица Л.В.*



ФГУП НПО «Микроген» Минздрава России филиал в г. Пермь
«Пермское НПО «Биомед»

Протокол от 23.05.2013 г.

**Определение специфической активности препарата
«Интерферон человеческий лейкоцитарный Интерферон альфа
лиофилизат для приготовления раствора для интраназального введения и ингаляций
1000 МЕ» производства ФГУП «НПО «Микроген» Минздрава России филиал в
г. Пермь «Пермское НПО «Биомед»**

Серии №: П 700, П 759, П 761, П762, П763, П764

Культура клеток: SPEV, культивируемая на разработанной автором полусинтетической питательной среде

Концентрация: клеток/мл 300 000

Дата посадки клеток: 20.05.2013 г.

Дата титрования интерферона: 21.05.2013 г.

Определение дозы вируса VSV: 22.05.2013 г.

Доза внесенного вируса: 10^{-4}

Внесение дозы вируса: 22.05.2013 г.

Учет результатов титрования интерферона: 23.05.2013 г.

Титр интерферона вычисляют методом Спирмена-Кербера по формуле:

$$\log_2 ED_{50} = D_{\max} + d/n \times (p - n/2)$$

где D_{\max} - \log_2 разведения, выше которого произошла 100% защита (-)

d - \log_2 интервала между разведениями (1.0)

n - число лунок на каждую дозу (4)

p - число лунок, давших защиту (-) в D_{\max} и последующих разведениях

Противовирусную активность интерферона в МЕ вычисляют по формуле:

$$A_x = A_{CT}/a_{CT} \times a_x$$

A_x - противовирусная активность исследуемого образца интерферона в МЕ/амп.

A_{CT} - противовирусная активность Международного стандарта интерферона в МЕ/амп.

a_{CT} - титр Международного стандарта в данном опыте

a_x - титр исследуемого образца

КК- контроль культуры клеток

Определение титра вируса VSV:

Определение внесенной дозы вируса VSV

Разведение вируса	Цитопатическое действие				Разведение дозы вируса в lg	0	-1	-2	-3
-1	++++	++++	++++	++++					
-2	++++	++++	++++	++++					
-3	++++	++++	++++	++++	Цитопатическое действие	++++	+++	+	-
-4	+++	+++	++++	++++		+++	++	+	-
-5	++	++	+++	+++		++++	+++	+	-
-6	++	-	-	++		+++	+++	-	-
-7	-	-	-	-		доза внесенного вируса – 100 ТЦ/доза/0,1 мл			
КК	-	-	-	-					

**Титрование Международного стандарта ВОЗ
Интерферон альфа, (человеческий лейкоцитарный)
NIBSC код: 94/784, 11000 ME/амп.:**

Разведение препарата	Цитопатическое действие			
100	-	-	-	-
200	-	-	-	-
400	-	-	-	-
800	-	-	-	-
1600	+	+	+	+
3200	+	+	+	+
КК	-	-	-	-

Результат: Титр $2^{10,14} = 1128,3$

$A_{CT}/a_{CT} = 11000/1128,3 = 9,75$

Коэффициент = 9,75

**Титрование препарата «Интерферон человеческий лейкоцитарный»
серия П 700**

Разведение препарата	Цитопатическое действие			
50	-	-	-	-
100	-	-	-	-
200	-	-	+	+
400	+	+	+	+
800	+	+	+	+
1600	+	+	+	+
КК	-	-	-	-

Результат: Титр $2^{7,64} = 199,47$

$A_x = 199,47 \times 9,75 = 1944 \text{ ME/амп.}$

**Титрование препарата «Интерферон человеческий лейкоцитарный»
серия П 759**

Разведение препарата	Цитопатическое действие			
50	-	-	-	-
100	-	-	-	-
200	-	-	+	+
400	+	+	+	+
800	+	+	+	+
1600	+	+	+	+
КК	-	-	-	-

Результат: Титр $2^{7,64} = 199,47$

$A_x = 199,47 \times 9,75 = 1944 \text{ ME/амп.}$

**Титрование препарата «Интерферон человеческий лейкоцитарный»
серия П 761**

Разведение препарата	Цитопатическое действие			
50	-	-	-	-
100	-	-	-	-
200	+	-	-	+
400	+	+	+	+
800	+	+	+	+
1600	+	+	+	+
КК	-	-	-	-

Результат: Титр $2^{7,64} = 199,47$
 $A_x = 199,47 \times 9,75 = 1944 \text{ МЕ/амп.}$

**Титрование препарата «Интерферон человеческий лейкоцитарный»
серия П 762**

Разведение препарата	Цитопатическое действие			
50	-	-	-	-
100	-	-	-	-
200	-	-	+	+
400	+	+	+	+
800	+	+	+	+
1600	+	+	+	+
КК	-	-	-	-

Результат: Титр $2^{7,64} = 199,47$
 $A_x = 199,47 \times 9,75 = 1944 \text{ МЕ/амп.}$

**Титрование препарата «Интерферон человеческий лейкоцитарный»
серия П 763**

Разведение препарата	Цитопатическое действие			
50	-	-	-	-
100	-	-	-	-
200	+	+	-	-
400	+	+	+	+
800	+	+	+	+
1600	+	+	+	+
КК	-	-	-	-

Результат: Титр $2^{7,64} = 199,47$
 $A_x = 199,47 \times 9,75 = 1944 \text{ МЕ/амп.}$

**Титрование препарата «Интерферон человеческий лейкоцитарный»
серия П 764**

Разведение препарата	Цитопатическое действие			
50	-	-	-	-
100	-	-	-	-
200	-	+	-	+
400	+	+	+	+
800	+	+	+	+
1600	+	+	+	+
КК	-	-	-	-

Результат: Титр $2^{7,64} = 199,47$
 $A_x = 199,47 \times 9,75 = 1944 \text{ ME/амп.}$

Заключение: серии П 700, П 759, П 761, П 762, П 763, П 764 соответствуют требованиям ФСП ЛС-001078-130711 по показателю «специфическая активность».

Начальник отделения интерферона
 ФГУП НПО «Микроген»
 Филиал «Пермское НПО «Биомед»
 кандидат медицинских наук

 Е.Н. Перевозчикова

Микробиолог отделения интерферона
 ФГУП НПО «Микроген»
 Филиал «Пермское НПО «Биомед»

 Л.Б. Гужева

*Подписи Перевозчиковой Е.Н., Гужевой Л.Б.
 удостоверяю.
 Начальник отдела Манурица Л.В.*





Федеральное государственное унитарное предприятие
«Научно-производственное объединение «Микроген» Минздрава Российской Федерации
Филиал в г. Пермь «Пермское НПО «Биомед»

ОГРН 1037722027727, ИНН 7722292838, КПП 590402001, ОКПО 04862997, ОКВЭД 24.41
Место нахождения, почтовый адрес: ул. Братская, 177, г. Пермь, 614089, Тел. (факс) 8(342)281 94 96, 262 33 96

УТВЕРЖДАЮ

Директор филиала ФГУП НПО «Микроген»
Минздрава России в г. Пермь «Пермское
НПО «Биомед», д.м.н.

 Е. В. Орлова

2014 г.



**об испытаниях питательной среды, содержащей депротенизированный
гемодериват эритромаасы крови человека (ДГЭКЧ).**

Комиссия в составе начальника отдела контроля качества Перевозчикова А. Б., микробиологов отделения интерферона Гужевой Л. Б., Кривоноговой О. Г. удостоверяет, что на базе отделения интерферона цеха препаратов крови ФГУП «НПО «Микроген» Минздрава России в г. Пермь «Пермское НПО «Биомед» были проведены испытания ростовой питательной среды, содержащей ДГЭКЧ, для культивирования перевиваемой клеточной линии почки эмбриона свиньи (SPEV). Препарат ДГЭКЧ и питательная среда, его содержащая, были получены аспирантом кафедры промышленной технологии лекарств с курсом биотехнологии ГБОУ ВПО «Пермской государственной фармацевтической академии» Минздрава России Малыгиной Дарьей Юрьевной.

Представленная для испытания питательная среда характеризовалась составом: 85% среды 199 и 15% раствора ДГЭКЧ. В соответствии с требованиями, предъявляемыми к ростовым питательным средам, оценку качества питательной среды, содержащей ДГЭКЧ, проводили по следующим показателям: pH, концентрация аминокислот, содержание хлоридов (МУК 4.2.2316-08), а так же определяли индекс пролиферации клеточной линии SPEV (ФС 42-3724-99). По всем указанным физико-химическим параметрам среда, содержащая ДГЭКЧ, соответствовала нормам, а так же превосходила по показателям индексов пролиферации клеточной линии SPEV контрольную среду – 199. Доказано, что клетки полученные на питательной среде, содержащей ДГЭКЧ, могут быть использованы в технологическом процессе производства человеческого лейкоцитарного интерферона при оценке его противовирусной активности.

Таким образом, выполненные исследования по оценке качества питательной среды, содержащей ДГЭКЧ, доказывают, что среда предложенного состава может быть использована в промышленном производстве человеческого лейкоцитарного интерферона на стадии контроля полуфабриката как заменитель цельной 199 среды для культивирования клеточной линии SPEV.

Начальник отдела контроля качества  Перевозчиков А. Б.

Микробиолог отделения интерферона  Гужева Л. Б.

Микробиолог отделения интерферона  Кривоногова О. Г.

*Подписи Перевозчикова А.Б., Гужевой Л.Б., Кривоноговой О.Г.
Удостоверяю. Начальник ФАП П. П. Макарина Л.В.*



РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(19) **RU** ⁽¹¹⁾ **2012 123 195** ⁽¹³⁾ **A**(51) МПК
C12P 21/06 (2006.01)

(12) ЗАЯВКА НА ИЗОБРЕТЕНИЕ

(21)(22) Заявка: 2012123195/10, 05.06.2012

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 05.06.2012

(43) Дата публикации заявки: 10.12.2013 Бюл. № 34

Адрес для переписки:

614107, г.Пермь, ул. Уральская, 45-40, Д.Ю.
Мальгиной

(71) Заявитель(и):

Волкова Лариса Владимировна (RU),
Казьянин Александр Викторович (RU),
Мальгина Дарья Юрьевна (RU)

(72) Автор(ы):

Волкова Лариса Владимировна (RU),
Казьянин Александр Викторович (RU),
Мальгина Дарья Юрьевна (RU)

(54) СПОСОБ ВЫДЕЛЕНИЯ НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫХ ПЕПТИДОВ

(57) Формула изобретения

Способ выделения низкомолекулярных пептидов, включающий ферментативный гидролиз исходного сырья, центрифугирование с последующей стерилизующей фильтрацией полученной субстанции через мелкопористые фильтры с диаметром пор 0,2 мкм, отличающийся тем, что в качестве исходного сырья используют эритромуку крови доноров, или не утилизируемые отходы технологии интерферона, которую предварительно подвергают гемолизу, вирусинактивации, инактивации фермента после ферментативного гидролиза, осветлению и сушке.

RU 2012123195 A

RU 2012123195 A