

Т.Н. Пивненко, Н.Н. Ковалев, Т.С. Запорожец,  
Н.Н. Беседнова, Т.А. Кузнецова

**Ферментативные гидролизаты  
из гидробионтов Тихого океана  
как основа для создания биологически  
активных добавок к пище и продуктов  
функционального питания**



Владивосток  
Дальнаука  
2015

УДК 577.113:197–1.05

ББК 28.072

ПЗ2

*Пивненко Т.Н.* Ферментативные гидролизаты из гидробионтов Тихого океана как основа для создания биологически активных добавок к пище и продуктов функционального питания : монография / Т.Н. Пивненко, Н.Н. Ковалёв, Т.С. Запорожец, Н.Н. Беседнова, Т.А. Кузнецова. – Владивосток : Дальнаука, 2015. – 160 с.

ISBN 978-5-8044-1559-5

Обобщены результаты многолетних исследований в области биотехнологии морских организмов, представлены сведения о составе и свойствах биологически активных веществ гидробионтов, явившиеся обоснованием возможности широкого, в том числе клинического использования разработанных биологически активных добавок к пище и продуктов функционального питания.

Издание предназначено для биохимиков, биотехнологов, фармакологов, фармацевтов и практикующих врачей.

© Т.Н. Пивненко, Н.Н. Ковалев,  
Т.С. Запорожец, Н.Н. Беседнова,  
Т.А. Кузнецова 2015  
© Дальнаука, 2015

ISBN 978-5-8044-1559-5

## Оглавление

От авторов .....	7
Введение.....	9
ГЛАВА 1. БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫЕ ДОБАВКИ К ПИЩЕ НА ОСНОВЕ ГИДРОЛИЗАТОВ МОЛЛЮСКОВ.....	12
Экспериментальное обоснование возможности применения БАД к пище на основе ферментативных гидролизатов из моллюсков в качестве средства сопровождения базисной терапии при различных патологических процессах .....	17
Действие ГМ на функциональную активность нейтрофилов и макрофагов.....	17
Применение ГМ для коррекции различных патологических состояний у людей.....	18
Влияние ГМ на факторы врожденного и адаптивного иммунитета у пожилых людей .....	19
Антиоксидантные свойства ГМ .....	22
Применение ГМ в офтальмологии .....	25
Влияние ГМ на регенеративные процессы в гнойной ране.....	28
ГЛАВА 2. БАД К ПИЩЕ НА ОСНОВЕ ГИДРОЛИЗАТОВ ГОНАД МОРСКИХ ОРГАНИЗМОВ.....	32
Получение гидролизатов из молок лососевых рыб .....	33
Экспериментальное обоснование возможности применения низкомолекулярной ДНК (нДНК) из молок лососевых рыб в качестве средства сопровождения базисной терапии при различной патологии .....	38
Токсичность и безвредность нДНК .....	38
Действие нДНК и олигонуклеотидов на иммунную систему .....	39
Эффективность нДНК при экспериментальной острой лучевой болезни .....	40
Влияние нДНК из молок лососевых рыб на выживаемость и среднюю продолжительность жизни облученных животных.....	41
Влияние нДНК на кроветворение при острой лучевой болезни.....	43
Противоопухолевая активность нДНК на модели карциномы Льюиса .....	44
Антиинфекционное действие нДНК.....	44
Антитоксическое действие нДНК.....	45
Исследование клинической эффективности нДНК в качестве средства сопровождения базисной терапии при различных патологических процессах .....	46

Действие нДНК на центральную нервную систему.....	46
Влияние нДНК на состояние иммунной и антиоксидантной систем у пожилых людей .....	47
Влияние нДНК на цитокиновый статус здоровых доноров.....	48
Иммуномодулирующее действие нДНК при онкологических процессах.....	50
<b>ГЛАВА 3. БАД К ПИЩЕ НА ОСНОВЕ ГИДРОЛИЗАТОВ ИЗ ХРЯЩЕВОЙ ТКАНИ МОРСКИХ ОРГАНИЗМОВ.....</b>	<b>52</b>
Состав ферментативных гидролизатов из хрящевой ткани (ГХ) гидробионтов .....	58
Фракционный состав ферментативных гидролизатов из хрящевой ткани гидробионтов .....	61
Исследование состава свободных дисахаридов.....	66
Аминокислотный состав ферментативных гидролизатов из хрящевой ткани гидробионтов .....	70
Противовоспалительная активность гидролизатов из хрящевой ткани гидробионтов .....	70
Влияние ферментативных гидролизатов из хрящевой ткани гидробионтов на экспрессию активационных мембранных лимфоцитов периферической крови .....	72
Эффективность БАД к пище из хрящевой ткани гидробионтов при полиостеоартрозе .....	75
<b>ГЛАВА 4. ГИДРОЛИЗАТЫ ИЗ МЫШЕЧНОЙ ТКАНИ ГОЛОТУРИЙ.....</b>	<b>78</b>
Тритерпеновые гликозиды.....	78
Противоопухолевая активность БАВ голотурий.....	81
Мышечная и соединительная ткань голотурий, .....	82
Применение продукции из кукумарии для лечения ожоговых больных.....	84
Применение гидролизата из кукумарии в качестве биологически активной добавки к рациону питания больных, перенесших радикальные обширные операции.....	86
Применение гидролизата из кукумарии в качестве биологически активной добавки при лечении вирусного гепатита А.....	87
Изучение влияния гидролизата из кукумарии на сперматогенез у половозрелых беспородных мышей-самцов .....	87
Пептиды гидролизованного коллагена голотурий .....	89

<b>ГЛАВА 5. БАД К ПИЩЕ НА ОСНОВЕ ИММУНОРЕГУЛЯТОРНЫХ НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫХ ПЕПТИДНЫХ ПРЕПАРАТОВ ИЗ НЕРВНОЙ ТКАНИ КАЛЬМАРОВ .....</b>	<b>91</b>
Пептиды ганглиев кальмаров. Выделение и основные свойства.....	93
Противовоспалительная активность пептидов нервной ткани кальмаров.....	97
Влияние пептидного препарата на гуморальный иммунитет.....	98
Действие пептидного препарата из нервной ткани кальмара на уровень $\gamma$ -интерферона в плазме крови животных, получивших ксенобиотики.....	103
Экспериментальное обоснование возможности клинического применения препарата при клещевом энцефалите .....	105
Клинические эффекты пептидного препарата из нервной ткани кальмаров.....	111
Влияние пептидного препарата на холинэстеразную активность и перекисное окисление липидов крови .....	112
Использование пептидного препарата при онкологических заболеваниях .....	112
Использование пептидного препарата для коррекции иммунных нарушений у онкогинекологических больных с послеоперационными осложнениями хирургических вмешательств.....	114
Применение пептидного препарата из нервной ткани кальмара в комплексном лечении дисбактериоза кишечника у детей с аллергодерматозами.....	123
Применение пептидного препарата из нервной ткани кальмара для коррекции нарушений в системе гемостаза у больных с бронхообструктивным синдромом.....	127
Пептидный препарат из нервной ткани кальмара в комплексном лечении пневмонии у лиц с алкогольной и наркотической зависимостью .....	132
Применение БАД на основе пептидного препарата из нервной ткани кальмара в комплексном лечении псориаза .....	133
Применение БАД на основе пептидного препарата из нервной ткани кальмара в офтальмологии .....	133
Применение БАД на основе пептидного препарата из нервной ткани кальмара в комплексном лечении пациентов с инфекционным эндокардитом .....	134
Влияние БАД на основе пептидного препарата из нервной ткани кальмара на показатели центральной и периферической гемодинамики у практически здоровых лиц, выполняющих работу с психоэмоциональными перегрузками .....	136

---

---

Применение БАД на основе пептидного препарата из нервной ткани кальмара при хронических вирусных гепатитах на фоне наркотической зависимости .....	137
Применение БАД на основе пептидного препарата из нервной ткани кальмара при псевдотуберкулезе .....	137
Применение БАД на основе пептидного препарата из нервной ткани кальмара при гонорее .....	138
Применение БАД на основе пептидного препарата из нервной ткани кальмара при герпетической инфекции .....	140
Стратегия применения пептидов из нервной ткани гидробионтов .....	144
Литература .....	146
Приложение.....	157

---

---

## От авторов

В настоящем издании обобщены результаты многолетних исследований по биотехнологии морских организмов, составу и свойствам биологически активных веществ (БАВ) гидробионтов, разработке технологий биологически активных добавок (БАД) к пище и их практическому применению. Одним из основателей этого направления научных исследований на Дальнем Востоке России был доктор биологических наук, профессор, лауреат Государственной премии СССР в области науки Леонид Мендельевич Эпштейн. Учениками его школы разработаны фундаментальные основы биоконверсии морского сырья, позволившие создать ряд функциональных пищевых продуктов и БАД к пище, пользующихся широким спросом у населения.

Под руководством академика РАН доктора медицинских наук Н. Н. Беседновой проведены медико-биологические исследования активности БАВ из гидробионтов Тихого океана, явившиеся обоснованием возможности клинического использования разработанных БАД к пище и продуктов функционального питания.

В монографии представлены сведения по биотехнологии БАД к пище, полученных на основе ферментоллизатов моллюсков, гонад и хрящевой ткани морских гидробионтов, а также иммуноактивных пептидов из нервной ткани кальмаров. Приведены собственные и литературные данные о практическом опыте клинического применения БАД к пище, разработанных авторами настоящего издания.

Представленные в книге собственные материалы авторов, а также краткие литературные справки свидетельствуют о перспективности дальнейших исследований в этой области, поскольку биологически активные вещества из гидробионтов, представленные на страницах этого издания, могут стать основой для создания безвредных мишеньориентированных лекарственных препаратов нового поколения для лечения ряда острых и хронических инфекционно-воспалительных процессов, онкологических заболеваний, возрастной патологии, осложнений, связанных с химио- и лучевой терапией онкологических больных. Новые и уже разработанные и представленные на страни-

---

---

цах этого издания БАД к пище позволят внести в рацион человека биологически активные вещества различной химической природы, необходимые для нормального функционирования организма.

Авторы выражают глубокую благодарность сотрудникам ТИПРО-Центра, Научно-исследовательского института эпидемиологии и микробиологии им. Г. П. Сомова, Тихоокеанского государственного медицинского университета, а также практикующим врачам, материалы работ которых вошли в настоящую монографию

Книга предназначена для биохимиков, биотехнологов, фармакологов, фармацевтов и практикующих врачей, использующих БАД к пище в комплексе лечения заболеваний различной этиологии.

---

---

## ВВЕДЕНИЕ

Анализ состояния здоровья и низкий уровень продолжительности жизни населения свидетельствует о том, что значительная его часть не может обеспечить себя питанием, которое могло бы восполнить дефицит микронутриентов и преодолеть так называемый «скрытый голод» (ВОЗ, 2014, 2-я международная конференция по вопросам питания. Рим, 19–21 ноября 2014 г. Римская декларация по вопросам питания). Крупномасштабные эпидемиологические исследования фактического состояния питания и здоровья населения в различных регионах России позволили установить структуру наиболее распространенных нарушений пищевого статуса, приводящих к снижению уровня здоровья и способствующих развитию таких заболеваний, как сердечно-сосудистые, онкологические, диабет, остеопороз, железо-дефицитная анемия, острые и хронические инфекции и др. (Тутельян, Суханов, 2009; Рахманов и др., 2014). Научно-техническая революция в последние 40–50 лет привела к существенному снижению энергозатрат у современного человека. Результат этого – несбалансированное питание, повышенное потребление жирной, сладкой, рафинированной и соленой пищи, низкая физическая нагрузка. В силу особенностей питания современный человек недополучает с пищей необходимых пищевых волокон, микронутриентов – почти всех витаминов, многих минеральных веществ (кальций, цинк, железо, йод, селен и др.) и биологически активных соединений – флавоноидов, индолов, органических кислот и др. Для восполнения этого дефицита ученые разрабатывают природные комплексы, получившие у нас в стране название «биологически активные добавки к пище» (БАД), которые являются частью правильного, здорового питания человека. Регулярное использование БАД позволяет достаточно легко восполнить дефицит основных питательных веществ. Без БАД к пище рассчитывать на здоровье и хорошее самочувствие сегодня не может ни здоровый, ни больной человек.

В странах Европы, США и цивилизованных странах Востока БАД давно вошли в культуру питания и стали неотъемлемой частью здорового образа жизни. В России, к сожалению, они до сих пор исполь-

---

зуются недостаточно широко. Агрессивная реклама в ряде случаев недобросовестные производители этих природных комплексов, ангажированность СМИ фармацевтическими фирмами и многое другое – вот причины того, что в России БАД используют примерно 3–5 % населения.

В отличие от лекарственных средств, включающих биологически активные вещества в лечебных дозах, обычно в десятки и сотни раз превышающих физиологическую потребность здорового человека и вводимых в организм как *per os*, так и парентерально, БАД используются с целью восполнения дефицита этих веществ в рационах в количествах, находящихся в их суточной дозе в пределах физиологических потребностей человека. Они применяются только *per os* с пищей во время еды (Тутельян, Суханов, 2009).

БАД к пище могут использоваться не только как профилактические средства, но и при различных заболеваниях, но обязательно наряду с применением специфической терапии и только в качестве элемента лечебной диеты, но ни в коем случае не в роли лекарственного средства. Применение БАД в этом случае помогает сократить продолжительность болезни, ускорить выздоровление больных, избежать ряда осложнений и хронизации процесса, снизить объемы специфической химиотерапии и сроки пребывания пациентов в стационарах.

В этой связи большой интерес представляют природные комплексы, выделенные из различных морских гидробионтов – беспозвоночных животных, рыб, водорослей, морских микроорганизмов. Биологическое разнообразие Мирового океана составляет фактически неограниченный ресурс в области создания новых активных соединений. Вещества, выделенные из морских гидробионтов, обладают широким спектром биологической активности, включая антибактериальные и противовирусные, противогрибковые, про- и противовоспалительные, иммуномодулирующие, противоопухолевые, цитотоксические свойства. С тех пор как Океан стал привлекать к себе интерес ученых и фармацевтических компаний, из морских организмов были выделены и охарактеризованы тысячи соединений различной химической структуры, зарегистрированы сотни патентов, ряд биоактивных морских соединений находится в настоящее время в стадии клинических испытаний, главным образом в обла-

---

сти противоопухолевой, обезболивающей, липидкорректирующей и противовоспалительной терапии.

Таким образом, создание новых соединений широкого диапазона действия, создающее предпосылки для использования их в качестве основы для конструирования лекарственных препаратов, биологически активных добавок к пище (БАД), продуктов функционального питания, а также создания промышленных технологий при комплексной переработке промысловых видов гидробионтов Тихоокеанского бассейна в регионе Дальнего Востока, является весьма актуальным.

Новые технологии БАД к пище из водно-биологического сырья включают в качестве основной стадии ферментативный гидролиз с использованием различных классов ферментов (протеиназ, нуклеаз, коллагеназ, гиалуронидаз), что позволяет обогатить получаемые продукты целевыми действующими компонентами различной направленности.

Учеными дальневосточных институтов получены ферментативные гидролизаты (ФГ):

- из моллюсков, обогащенные свободными аминокислотами, включая таурин, стимулирующими сердечно-сосудистую систему, функции зрения;
- гонад гидробионтов, обогащенные свободными аминокислотами и олигонуклеотидами, повышающими физическую и умственную работоспособность;
- хрящевой ткани гидробионтов, содержащие аминосахара, хондротинсульфаты, тканевые ингибиторы металлопротеиназ и растворимый коллаген, в качестве источника соединений, стимулирующих метаболизм соединительной ткани;
- мускульного мешка голотурий (трепанга и кукумари), содержащие фрагменты растворимого коллагена, хондроитинсульфаты и тритерпеновые гликозиды, обладающие хондропротекторным и иммуностимулирующим действием;
- нервной ткани гидробионтов, содержащие пептиды широкого спектра действия (Пивненко, Ковалев, 2015).

В настоящей монографии изложены результаты исследования состава и основных медико-биологических эффектов ФГ из гидробионтов Тихого океана, использованных для создания биологически активных добавок к пище и продуктов функционального питания.

## БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫЕ ДОБАВКИ К ПИЩЕ НА ОСНОВЕ ГИДРОЛИЗАТОВ МОЛЛЮСКОВ

Морские беспозвоночные, в частности моллюски, с глубокой древности используются в народной медицине. С середины XX в. они стали объектом всестороннего изучения как источник разнообразных биологически активных веществ. Известно, например, что у морских беспозвоночных животных сравнительно редко встречаются злокачественные новообразования. Это обстоятельство легло в основу поиска соединений с антиопухолевой активностью с использованием морских беспозвоночных в качестве объектов такого поиска (Кароор, 2013).

В других исследованиях установлена иммуномодулирующая, антикоагулянтная, противовоспалительная, антимикробная и противовирусная активность экстрактов и различных соединений, выделенных из моллюсков (Попов и др., 2013). Исследования последних десятилетий показали, что ряд природных соединений, выделенных из морской биоты, являются структурно уникальными, отсутствуют у наземных животных и могут служить основой для конструирования новых лекарственных препаратов, биологически активных добавок к пище, а также продуктов функционального питания (Беседнова, Эпштейн, 2004; Запорожец, 2006; Кузнецова, 2009).

Для моллюсков, обитающих во всех широтах Мирового океана, характерен большой спектр необходимых организму человека биологически активных веществ: микроэлементов, витаминов, хорошо усвояемых жиров, белков и особенно аминокислот. Обращает на себя внимание тот факт, что в России, к сожалению, употребляют в пищу небольшое число видов моллюсков. Большое значение имеет и то, что для получения БАВ можно использовать и непищевые органы и ткани этих животных, что может способствовать рациональному использованию отходов переработки гидробионтов, разработке

новых технологий БАД и уменьшению вредного воздействия отходов на окружающую среду.

Наибольшее промышленное значение в России имеют двустворчатые (мидии, гребешки) и головоногие (кальмары) моллюски. Общее содержание свободных аминокислот у морских беспозвоночных намного выше, чем у наземных животных и пресноводных гидробионтов. Морские беспозвоночные используют эти компоненты для поддержания осмотического равновесия. При этом они с легкостью усваивают из окружающей среды или выделяют в нее аминокислоты и другие органические вещества через поверхность тела. Наличие свободных аминокислот в организме беспозвоночных позволяет им регулировать клеточный объем и запастись питательными веществами. Среди экстрактивных веществ у беспозвоночных гидробионтов в наибольшем количестве представлен таурин, содержание которого достигает 56–73 мкМ/г сырой ткани (до 50% от общего количества экстрактивных веществ).

Исследование сырьевых источников для получения БАД показало, что основную долю небелковых азотистых веществ в тканях моллюсков составляют свободные аминокислоты (САК) – в среднем 1,3 г на 100 г ткани. При этом их состав у отдельных видов моллюсков отличается как видоспецифичностью, так и общими характеристиками, в частности близким содержанием таурина и гистидинсодержащих дипептидов (ГСД) (Табл. 1).

Основу БАД к пище, разработанных авторами настоящей монографии, составляли гидролизаты из двустворчатых (мидия, гребешок, мактра, мерценария и др.) и головоногих (кальмары и осьминоги) моллюсков. Основными компонентами этих биопрепаратов являются САК (50–70%) и гистидинсодержащие дипептиды (Давидович, Пивненко, 2001).

В тканях приморского гребешка обнаружено 15 свободных аминокислот, в тканях мидии – 18; преобладают таурин и глицин. Из 19 свободных аминокислот, обнаруженных в щупальцах и мантии кальмара, наибольшее количество приходится на пролин. Отличительные черты состава мантии этого моллюска, кроме того, – меньшее количество таурина, высокое содержание лизина и очень высокий уровень ГСД.

Таблица 1

Содержание свободных аминокислот в сырьевых источниках для получения гидролизатов, % от суммы САК

Компонент	Приморский гребешок	Мидия	Кальмар	
			щупальцы	мантия
Таурин	54,70	50,11	23,15	8,01
Аспарагиновая кислота	1,53	3,99	1,57	0,22
Треонин	0,76	1,07	0,92	0,73
Глутаминовая кислота	2,84	6,05	2,94	1,06
Пролин	0	1,35	29,0	29,58
Глицин	26,95	20,63	5,08	1,90
Аланин	5,17	5,69	7,92	4,00
Цистеин	0	0	0,51	0,06
Валин	0,16	0,25	0,56	0,44
Метионин	Следы	0,33	0,58	0,52
Изолейцин	0,18	0,42	0,71	0,59
Лейцин	0,49	0,51	1,39	1,13
Тирозин	0,19	0,43	0,31	0,21
Фенилаланин	0,23	0,28	0,59	0,44
β-Аланин	0,12	0,32	0,28	0,34
Орнитин	0	0,39	0,60	0,12
Лизин	0,80	1,65	0,90	36,26
Гистидин	0,11	0,37	1,03	5,79
Триптофан	0	0	0	0
Аргинин	5,71	6,09	13,79	1,85
ГСД	0,03	0,03	8,36	6,29

В качестве перспективных источников исследованы новые для промысла виды двустворчатых моллюсков: спизула сахалинская, корбикула, каллиста короткосифонная, мерценария Стимпсона, мактра, анадара (Табл. 2). Было установлено, что в тканях анадары обнаружено 14, каллисты – 11, мактры – 8 свободных аминокислот, среди которых преобладает таурин. В тканях мерценарии было определено всего 5 свободных аминокислот при очень высоком содержании таурина. У всех видов моллюсков отсутствует свободный триптофан. В некоторых видах моллюсков обнаружено высокое со-

Таблица 2

Содержание САК и ГСД в тканях некоторых видов двустворчатых моллюсков, % от суммы САК

Компонент	Корбикула	Анадара	Мерценария	Мактра	Каллиста
Таурин	9,47	47,9	95,03	48,13	70,3
Цитруллин	37,9	9,72	0	41,45	17,26
β-Аланин	0	0,81	0	0	0,28
Орнитин	0	2,02	0	1,33	0
Ароматические аминокислоты В т.ч. триптофан	11,14 0	2,89 0	3,39 0	0,69 0	1,79 0
Дикарбоновые аминокислоты	17,49	12,99	0	6,23	2,85
Диаминокислоты	0	11,45	0,35	0	0,28
Серусодержащие аминокислоты	4,99	1,17	0,45	0	0,80
Алифатические	10,37	3,92	0,78	0	2,63
Нейтральные	6,29	2,47	0	0,59	1,62
Пролин	Н.о.	Н.о.	Н.о.	Н.о.	Н.о.
Гистидин	2,65	1,84	0	0,15	0,49
ГСД	0	3,03	0,01	1,47	1,79

Примечание. Н.о. – не определяли.

держание цитруллина и орнитина, которые по литературным данным (Куваева и др., 2012) обладают гепатопротекторным действием, повышают энергообеспечение организма и стимулируют иммунитет.

Таким образом, для получения БАД могут быть использованы все исследованные виды двустворчатых моллюсков, за исключением корбикулы вследствие низкого содержания таурина и отсутствия ГСД.

Для проведения гидролиза были использованы ферментные препараты пилорин и гепатопанкреатин, содержащие сериновые протеиназы трипсинового и химотрипсинового типа, а также микробные – мегатерин и протамекс, в составе которых представлены протеиназы нескольких подклассов. Основным фактором, лимитирующим глубину гидролиза, являются активность и субстратная специфичность ферментных препаратов. Наиболее высокая казеи-



нолитическая активность была характерна для ферментов, содержащихся в препаратах микробиального происхождения – протамексе и мегатерине, более высокая коллагенолитическая – в гепатопанкреатине и пилорине. Кинетика гидролиза белков тканей моллюсков при различных концентрациях подчинялась тем же закономерностям, которые были установлены для чистых белковых субстратов. Накопление растворимых белковых компонентов оценивали по приросту растворимого белка.

Полученные результаты позволяют рекомендовать для расщепления таких белоксодержащих субстратов, как щупальца кальмара и мантия гребешка, – панкреатические протеиназы животного происхождения, для мышечной ткани кальмара – микробиальные (Давидович, 2006).

После проведения гидролиза, инактивации ферментов, отделения и сушки целевого продукта был определен его состав: содержание свободных аминокислот составило 56–70 % с наибольшим количеством таурина в гидролизатах мидии, а ГСД – в гидролизатах щупальцев кальмара. При сравнении состава САК в ФГ из различных источников установлены отличительные черты, свойственные только данному препарату (Табл. 3).

Таблица 3

Содержание САК в ферментативных гидролизатах из различных сырьевых источников, % от суммы САК

Аминокислоты	Содержание				
	Минтай	Тюлень	Мидия	Гребешок	Кальмар
Таурин	0	0	10,0	6,4	8,3
Пролин	3,7	4,6	5,9	6,2	5,7
Нейтральные	11,5	12,7	9,8	8,3	5,8
Дикарбоновые	14,7	8,9	15,0	11,5	26,1
Серусодержащие	6,4	2,6	4,0	4,8	3,1
Алифатические	23,9	37,3	28,0	30,1	21,3
Основные	16,3	14,9	15,5	17,5	14,2
Ароматические	23,5	18,7	11,5	15,6	12,7
$\Sigma_{\text{ал}}:\Sigma_{\text{осн}}:\Sigma_{\text{ар}}$	2:1:2	3:1:1	2:1:1	2:1:1	2:1:1

Наиболее характерными чертами аминокислотного состава БАД на основе ГМ, позволяющими установить подлинность, были, во-первых, наличие и высокое содержание таурина и, во-вторых, соотношение суммарного количества алифатических, основных и ароматических аминокислот ( $\Sigma_{\text{ал}}:\Sigma_{\text{осн}}:\Sigma_{\text{ар}} = 2:1:1$ ). В гидролизатах из других источников таурин отсутствует, а показатели соотношения выбранных аминокислот варьируются (Давидович, 2006).

### Экспериментальное обоснование возможности применения БАД к пище на основе ферментативных гидролизатов из моллюсков в качестве средства сопровождения базисной терапии при различных патологических процессах

Определение острой и хронической токсичности гидролизата из моллюсков (ГМ) проводили на кафедре физиологии Пермской государственной фармацевтической академии. С целью выявления возможной видовой реакции животных на ГМ эксперименты проводили на двух видах лабораторных животных – крысах и мышах. В опытах на крысах изучали влияние биопрепарата на массу тела животных и показатели системы крови. Влияние на систему крови оценивали по изменению общего количества лейкоцитов и лейкоцитарной формулы. При этом все показатели регистрировали трижды: до начала эксперимента, через 2 недели и через 1 месяц от начала введения ГМ.

Установлено, что ГМ не влияет на массу тела животных, уровень гемоглобина и эритроцитов. В то же время у обоих видов животных увеличивается содержание в крови лейкоцитов.

### Действие ГМ на функциональную активность нейтрофилов и макрофагов

Защита организма от патогенного воздействия генетически чужеродных агентов осуществляется факторами врожденного и адаптивного иммунитета. К основным клеткам врожденного иммунитета относятся мононуклеарные фагоциты, гранулоциты и естественные киллеры.

---

Нейтрофилы составляют первую линию неспецифической противомикробной защиты. Они первыми мобилизуются в очаг воспаления или инфекции, и от их фагоцитарной активности зависит освобождение организма от возбудителей.

Показано, что в полиморфноядерных лейкоцитах (ПМЯЛ) и макрофагах *in vitro* и *in vivo* ГМ усиливает фагоцитарные процессы, при этом возрастает как поглотительная, так и переваривающая активность этих клеток.

Для исследования фагоцитарной активности нейтрофилов в модельной системе *in vitro* нейтрофилы крови здоровых доноров инкубировали с ГМ в течение 60 мин при 37°C в конечной концентрации – 1 мкг/мл, 10 мкг/мл, 100 мкг/мл с последующим внесением в клеточную суспензию золотистого стафилококка, частой причины гнойных процессов в организме. Эта модель позволяет оценить прямое действие биопрепаратов на фагоцитирующие клетки. В результате установлено, что инкубация нейтрофилов крови здоровых доноров с ГМ в концентрациях 1 мкг/мл и 10 мкг/мл через 30 мин приводит к увеличению количества клеток, участвующих в фагоцитозе, и усилению их поглотительной способности. В контроле изменений фагоцитарной активности нейтрофилов не было.

В экспериментах на неинбредных мышах, которым вводили внутримышечно ГМ за сутки до заражения вирулентным штаммом возбудителя псевдотуберкулеза, установлено, что биопрепарат на 19% увеличивает ФП – число поглощенных одним нейтрофилом микроорганизмов. Гидролизат из моллюсков в дозе 5 мг/кг увеличивает и процент нейтрофилов, участвующих в фагоцитозе.

Полученные материалы свидетельствуют о возможности использования ГМ в комплексе лечения пациентов с инфекционными процессами, при которых фагоцитоз является ведущим фактором в освобождении организма от возбудителя болезни.

#### *Применение ГМ для коррекции различных патологических состояний у людей*

На фоне применения ГМ проводили клинический анализ крови, а также определяли уровень цитокинов ИЛ-2, ИЛ-4, ИФН и растворимых рецепторов ИЛ-2 (SRIЛ-2) у спортсменов-гребцов (Мельников, Пивненко, 2014). Исследовали также содержание лактата, уро-

---

вень которого в 2 раза превышал значения референсных величин и коррелировал с развитием утомления при физической нагрузке. При первичном обследовании показатели лактата крови были повышены в 2 раза. Через 15 дней тренировочного процесса и приема БАД они снизились и у 50% спортсменов достигали нормы. Исследования спортсменов в период интенсивных тренировок показали положительное влияние ГМ на метаболические процессы и энергетический обмен при снижении уровня лактата в крови, усиление продукции ИФН и увеличение числа моноцитов в крови, чем обеспечивается усиление фагоцитарно-клеточной защиты.

#### *Влияние ГМ на факторы врожденного и адаптивного иммунитета у пожилых людей*

У обследованных пожилых людей до приема БАД было установлено снижение относительного содержания CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>-лимфоцитов, показателей спонтанного НСТ-теста, повышение уровня IgA в сыворотке крови и относительного содержания CD20<sup>+</sup>-лимфоцитов. После приема БАД в среднем по этим группам выявлено увеличение относительного содержания CD3<sup>+</sup>-, CD4<sup>+</sup>-, CD8<sup>+</sup>-лимфоцитов.

При анализе изменений показателей иммунного статуса после приема гидролизата с учетом исходного уровня показателей выделены три подгруппы пожилых людей:

- 1) с высокими показателями иммунного статуса (значения показателей, находящиеся в пределах верхней границы нормы и/или выше границ нормальных значений);
- 2) со средненормальными значениями (значения показателей, находящиеся на уровне средних значений физиологической возрастной нормы);
- 3) со сниженными показателями иммунного статуса (значения показателей, находящиеся в пределах нижней границы нормы и/или ниже границ средненормальных значений физиологической возрастной нормы).

После приема гидролизата нами (Шутикова и др., 2006а) установлены следующие закономерности: в группе пожилых людей с высокими показателями клеточного иммунитета наблюдалась их

---

нормализация до средненормальных значений; у пожилых людей со средними значениями показатели не изменялись; при сниженных значениях показателей отмечалось их повышение до уровня средненормальных значений.

Относительное содержание CD3<sup>+</sup>-лимфоцитов в группе пожилых людей с высокими показателями после приема ГМ незначительно снижалось (с  $66,8 \pm 0,7\%$  до  $62,1 \pm 1,6\%$ ;  $p = 0,066$ ), оставаясь в границах физиологической возрастной нормы. В том случае, когда показатели были снижены, относительное содержание CD3<sup>+</sup>-лимфоцитов повышалось (с  $46,4 \pm 1,2\%$  до  $60 \pm 1,3\%$ ;  $p = 0,000$ ).

Относительное содержание CD4<sup>+</sup>-лимфоцитов практически у всех пожилых находилось на уровне нижней границы физиологической нормы либо было ниже ее. После приема гидролизата содержание CD4<sup>+</sup>-лимфоцитов увеличивалось (с  $28,1 \pm 0,9\%$  до  $34,8 \pm 0,9\%$ ;  $p = 0,000$ ).

Относительное содержание субпопуляции CD8<sup>+</sup> цитотоксических лимфоцитов/супрессоров после приема гидролизата у пожилых людей в группе со средненормальными значениями показателей незначительно снижалось или не изменялось. В том случае, когда показатели были снижены, относительное содержание этих клеток увеличивалось (с  $18,9 \pm 0,9\%$  до  $23,8 \pm 0,8\%$ ;  $p = 0,000$ ).

Для пожилого возраста характерно снижение не только противомикробного иммунитета, но и противовирусной и противоопухолевой защиты, в которой принимают участие натуральные киллеры (NK-клетки). В наших исследованиях после приема ГМ у лиц с низкими показателями содержание CD16<sup>+</sup>-лимфоцитов увеличивалось (с  $8,4 \pm 0,7\%$  до  $14,6 \pm 3,1\%$ ;  $p = 0,065$ ). У пожилых людей с высокими показателями CD16<sup>+</sup>-лимфоцитов после приема БАД наблюдалась нормализация данного показателя до уровня средненормальных значений (с  $22,9 \pm 1,6\%$  до  $11,5 \pm 1,7\%$ ;  $p = 0,000$ ). В группе обследуемых со средними показателями значимых изменений не выявлено.

Абсолютное количество В-клеток у пожилых людей, по данным литературы, не изменяется, однако относительное содержание может увеличиваться с возрастом как следствие усиления поликлональной активации, связанной со снижением содержания Т-лимфоцитов, а также супрессорной функции CD8<sup>+</sup>-лимфоцитов. В результате проведенных исследований мы также установили, что у большинства по-

---

жилых относительное содержание этих клеток находилось на уровне верхней границы физиологической нормы либо было выше ее. После приема гидролизата из моллюсков у людей с высокими показателями относительного содержания В-лимфоцитов выявлена тенденция к его снижению (с  $25,2 \pm 1,5\%$  до  $21,4 \pm 1,6\%$ ;  $p = 0,055$ ).

С возрастом часто наблюдается развитие дисбаланса основных классов иммуноглобулинов: в периферической крови уменьшается концентрация IgM, уровень IgA и IgG увеличивается (Кишов, Грабовский, 1996). Такое соотношение иммуноглобулинов, отражающее доминирование Th2-иммунного ответа у людей пожилого возраста, приводит к снижению противомикробной защиты и повышению восприимчивости к инфекциям. В наших исследованиях у большинства пожилых людей выявлена подобная закономерность, а также установлено модулирующее действие ГМ, зависящее от исходного уровня иммуноглобулинов.

Еще одним важным аспектом действия этого препарата является его способность оказывать положительное влияние на течение экспериментальной острой лучевой болезни.

В работе В. В. Потаповой (2005) неинбредных мышей массой 18–20 г облучали гамма-лучами Co<sup>60</sup> в дозе 7 Гр. Изменения показателей гемопоэза фиксировали на 2-, 3-, 9-, 14-, 23-и сутки после облучения. Гидролизат применяли через 30 мин после облучения подкожно в дозе 10 мг/кг как средство раннего лечения острой лучевой болезни.

В группе мышей, получавших гидролизат, наблюдалось менее выраженное уменьшение и более раннее восстановление массы животных и массы их лимфоидных органов (Потапова, 2005), чем у контрольных мышей. Аналогичным образом изменялась клеточность костного мозга, тимуса и селезенки у мышей, получавших гидролизат. Снижение показателей на 3 и 9 сутки не достигало минимальных величин, наблюдаемых в контрольной группе, а процесс восстановления начинался раньше и был более полным, чем у контрольных животных.

Таким образом, введение ГМ через 30 мин. после облучения способствует более полному и раннему восстановлению кроветворения, а также массы и клеточности лимфоидных органов по сравнению с животными контрольной группы (получавшими 0,85%-й раствор NaCl).

Выживание или гибель животного при воздействии на него ионизирующей радиации в определенном диапазоне доз создает четкую модель радиорезистентного/радиочувствительного состояния организма. Поэтому наиболее обоснованное заключение о радиозащитном действии препарата может быть сделано в том числе и на основании оценки его влияния на выживаемость и среднюю продолжительность жизни животного при облучении в диапазоне доз, вызывающих костно-мозговой синдром.

Мышам за 1 сут и через 1 сут после облучения давали ГМ перорально в дозе 10 мг/кг. Профилактическое введение не оказывало выраженного действия. Лечебная схема применения ГМ обеспечивала значительный эффект. Выживаемость животных, получавших гидролизат, по сравнению с контролем увеличивалась в 3 раза (в контроле –  $10 \pm 1,8\%$ , в опыте –  $30 \pm 4,4\%$ ).

Изменение средней продолжительности жизни у мышей опытной группы, получавших ГМ, было аналогичным показателям выживаемости. Пероральное введение препарата увеличивало среднюю продолжительность жизни (СПЖ) мышей: в контроле СПЖ составила  $10,0 \pm 1,8$  сут, в опыте –  $20,6 \pm 2,2$  сут.

#### *Антиоксидантные свойства ГМ*

Гидролизат из моллюсков обладает прямым умеренным антиоксидантным действием: связывает и инактивирует гипохлоританион (доказательство способности препарата связывать активные формы кислорода), ингибирует свободнорадикальный катион  $ABTS^{\cdot+}$ , снижает уровень малонового диальдегида (МДА) в модельной реакционной системе.

Определение антиоксидантной активности ГМ проводили в модельных экспериментах по накоплению малонового диальдегида (МДА) в сыворотке крови. МДА является одним из конечных продуктов перекисного окисления липидов, накапливающихся в сыворотке крови, и, будучи показателем интенсивности процессов окисления, применяется как медицинский маркер различных заболеваний. Накопление МДА может наблюдаться и в модельных экспериментах, где в качестве среды, содержащей окисляемые липиды, используют сыворотку крови человека и животных, содержащую липопроотеиды, жирные кислоты и белки, а в качестве катализатора

окисления – сульфат железа. Для определения антиоксидантной активности испытуемых гидролизатов их добавляли к реакционной смеси в таком количестве, чтобы выявить область концентраций, в которой происходит изменение антиоксидантного действия от полного подавления реакции к отсутствию эффекта. В качестве контроля использовали сыворотку крови с добавлением системы ускоренного окисления, но без испытуемых препаратов. Гидролизат из моллюсков в количестве 1000 мг обеспечивал антиоксидантную активность, эквивалентную 45 мг тролокса (синтетического аналога природного антиоксиданта токоферола). Защитный эффект БАД проявлялся в том, что она препятствовала накоплению в сыворотке крови человека МДА как продукта окисления липидов (в контроле прирост МДА  $0,070 \pm 0,0030$  мг/мл сыворотки крови; в опытной группе –  $0,032 \pm 0,0024$ ,  $p = 0,000$ ) (Шутикова и др., 2006б; Давидович и др., 2006).

Умеренное антиоксидантное действие ГМ позволяет использовать его в достаточно больших дозировках, необходимых для обеспечения включения в метаболизм различных тканей и органов. Умеренность антиоксидантного действия предпочтительна с точки зрения предотвращения дальнейшего окисления биологических субстратов, имеющего место при использовании мощных антиоксидантов, которые в высоких концентрациях становятся прооксидантами.

Антиоксидантные свойства ГМ также проявляли значительный эффект при экспериментальном охлаждении дыхательных путей. Так, общее охлаждение крыс в течение 28 дней вызывало значимое повышение содержания МДА (К –  $4,9 \pm 0,38$  нмоль/л, Х –  $6,06 \pm 0,34$  нмоль/л) и снижение уровня витамина Е (К –  $43,38 \pm 4,3$  мкг/г, Х –  $32,48 \pm 2,29$  мкг/г) в плазме крови крыс по сравнению с таковыми в группе интактных животных, которые служили контролем. Введение крысам гидролизата в дозе 10 мг/кг предупреждало усиление процессов перекисного окисления липидов и перерасход витамина Е при холодном стрессе. У этих животных содержание МДА и уровень витамина Е оставались на уровне показателей контрольной группы (МДА –  $4,978 \pm 0,241$  нмоль/л, витамин Е –  $39,771 \pm 2,158$  мкг/г) (Шутикова, 2009; Саяпина, Целуйко, 2011). Установлено также тканепротекторное действие гидролизата на предстательную железу

---

зу крыс при охлаждении: при действии низких температур нарушается синтетическая активность эпителия органа, на что указывают снижение концентрации гликопротеинов, хелатируемого цинка, угнетение экспрессии NO-синтетазы и E-кадгерина. На фоне приема гидролизата в эпителии увеличивается содержание гликопротеинов и хелатируемого цинка, увеличивается экспрессия NO-синтетазы и E-кадгерина, что в совокупности свидетельствует о восстановлении синтетической функции эпителия предстательной железы (Саяпина, Целуйко, 2011).

Гидролизат из моллюсков оказывал антиоксидантное действие и у людей. Так, было установлено, что у пожилых людей после приема препарата независимо от исходного состояния системы ПОЛ-АОЗ отмечено повышение интегрального показателя антиоксидантной активности (АОА) крови (с  $64,9 \pm 2,28$  до  $71,3 \pm 9,27\%$ ,  $p=0,005$ ) и снижение содержания конечного продукта пероксидации МДА (с  $6,62 \pm 0,16$  до  $5,56 \pm 0,27$  мкмоль/гНв,  $p=0,014$ ), при этом показатель МДА/АОА также снижался с  $0,10 \pm 0,004$  до  $0,07 \pm 0,005$ ,  $p=0,004$  (Шутикова, 2009).

Антиоксидантный эффект гидролизата был исследован и при других патологических процессах, в частности при множественной миеломе (ММ) – распространенном, особенно среди пожилых, людей гемобластическом заболевании, сопровождающемся снижением антиоксидантной защиты организма. В Приморском крае, как и повсеместно, заболеваемость этой патологией неуклонно растет. При ММ изменения происходят на уровне самых ранних предшественников В-лимфоцитов, которые сохраняют способность к дифференцировке до конечного этапа – плазматических клеток, секретирующих иммуноглобулины. В результате неуправляемой гиперплазии плазматических клеток в костном мозге происходит угнетение нормального кроветворения. Отмечается снижение уровня эритроцитов, лейкоцитов, тромбоцитов. Проведение стандартных схем лечения пациентов с ММ с использованием цитостатиков способствует еще большему угнетению процессов кроветворения. Анемия наряду с костно-деструктивным синдромом и синдромом белковой патологии считается одним из основных проявлений заболевания.

Эффективность ГМ была исследована у 89 пациентов с ММ в возрасте от 45 до 75 лет (Татаркина и др., 2001). При исследовании по-

---

казателей периферической крови у пациентов с ММ до лечения было выявлено достоверное снижение уровня гемоглобина, лейкоцитов и тромбоцитов. Через 2 недели было установлено, что проведенная полихимиотерапия (ПХТ) способствовала еще большему снижению уровней лейкоцитов и тромбоцитов. Содержание гемоглобина осталось практически на прежнем низком уровне. Применение гидролизата способствовало нормализации уровня лейкоцитов в период лечения, предотвращало нарастание тромбоцитопении, повышало уровень гемоглобина в крови.

Хорошим показателем при наблюдении за пациентами с ММ является состояние калликреин-кининовой системы (ККС). У всех больных ММ уровень калликреина был повышен по сравнению с нормой в три раза, причем наблюдалась тенденция к его увеличению с утяжелением болезни. Лечение пациентов с ММ с использованием стандартных программ полихимиотерапии не привело к нормализации активности ККС. Включение в схему лечения ГМ неоднозначно отразилось на состоянии ККС при различных стадиях заболевания. При IIA стадии активность калликреина осталась на том же уровне, что и до лечения. У больных с IIIA и IIIB стадиями ММ отмечено достоверное снижение активности всех параметров ККС по сравнению с таковыми до лечения и после лечения с использованием только стандартных схем полихимиотерапии. Таким образом, было доказано, что применение ГМ положительно влияет на процессы кроветворения, особенно в отношении лейкопоза и тромбоцитопоза. Кроме того, этот биопрепарат оказывает положительное действие на окислительные процессы в организме больных. Полученные результаты позволили рекомендовать включение гидролизата из моллюсков в схемы лечения не только больных ММ, но и при всех состояниях, сопровождающихся угнетением процессов кроветворения и явлениями гипоксии.

#### *Применение ГМ в офтальмологии*

Рост количества глазных заболеваний определяется многими факторами, в том числе неблагоприятной экологической обстановкой, техногенными воздействиями, нагрузкой на орган зрения, которая возрастает по мере развития цивилизации, инфекционными заболеваниями, генетическими факторами и возрастными измене-

---

---

ниями. Почти 60 % болезней глаз составляют воспалительные заболевания.

Несмотря на большое число исследований, которые проводились и проводятся в настоящее время, поиск новых средств для лечения офтальмологических заболеваний является актуальным. Одним из направлений научных исследований стал поиск регуляторов биологических реакций в тканях глаза. К такому классу соединений можно отнести свободные аминокислоты, которые включаются в метаболические процессы и благодаря этому оказывают значительный терапевтический эффект. К их числу прежде всего следует отнести таурин.

Таурин образуется в организме при ферментативном окислении сульфгидрильной группы цистеина с участием цистеиндеоксигеназы и последующим декарбоксилированием. Эта аминокислота способствует нормализации функции клеточных мембран, сохранению электролитного состава цитоплазмы (за счет накопления ионов калия и кальция), пролиферации клеток в культуре лимфоцитов человека и фибробластов плода, регуляции метаболических процессов – энергетического, углеводного, белкового, осморегуляции. Таурин крайне необходим для сетчатки глаза. На свету сетчатка теряет таурин, ночью он накапливается. Доказано, что недостаток таурина вызывает прогрессирующую дегенерацию сетчатки, приводящую к нарушению зрения меньше чем за два года. Потеря 50 % таурина от нормальной концентрации – необратимый процесс, приводящий к слепоте. Таурин стимулирует репаративные процессы при дистрофических нарушениях сетчатки глаза, травматических поражениях тканей глаза, улучшает светочувствительность сетчатки, являясь безвредным средством улучшения зрения в условиях низкой освещенности. Помимо нейромедиаторной таурин в сетчатке выполняет регенеративную функцию. Недостаток таурина в хрусталике и роговице приводит к катаракте.

Детальное исследование содержания таурина в сетчатке глаза показало его наличие во всех слоях с максимальным содержанием в наружном ядерном слое. Доказана важная роль таурина в функционировании фоторецепторных клеток. Помимо нейромедиаторной таурин в сетчатке глаза выполняет регенеративную функцию, поддерживает осмотическое равновесие в хрусталике. Эксперимен-

---

---

тальными работами показано, что таурин обладает рядом защитных свойств при воздействии на организм неблагоприятных факторов окружающей среды, оказывает антиоксидантное действие.

Таурин применяют при дистрофических поражениях сетчатки и роговицы, катаракте (старческая, диабетическая, травматическая, лучевая), травмах роговицы, открытоугольной глаукоме.

Как показано выше, в гидролизате из моллюсков содержится до 8 % таурина. Хотя свободные аминокислоты являются достаточно слабыми антиоксидантами в отдельности, но в сумме они (включая таурин и гистидинсодержащие дипептиды), по-видимому, способны дополнять и усиливать друг друга, составляя комплекс антиоксидантов. Для проверки этого были проведены эксперименты по оценке антиоксидантной активности препаратов различными методами, которые подтвердили выдвинутое предположение (Мельников и др., 2003, Давидович, 2006).

Согласно современным взглядам на патогенез ряда заболеваний, для которых характерно воспаление и деструкция собственных тканей в очаге поражения, в качестве основного поражающего агента может выступать гипохлорит-анион. В частности, присутствующий в хрусталике и сетчатке глаза фермент – миелопероксидаза при осуществлении своих функций образует гипохлориты. Последние, с одной стороны, являются метаболитами в естественных процессах, с другой стороны, способны повреждать ткани и органы. Было показано, что компоненты ГМ при взаимодействии с гипохлорит-анионом образуют неактивные хлораминовые комплексы. Возможно, что функция таурина, присутствующего в значительных количествах в сетчатке и других отделах глаза, включает нейтрализацию гипохлорит-аниона, чем объясняется антикатаральный и антиглаукомный эффект таурина, карнозина и гидролизата из моллюсков

*Эффективность ГМ при первичной открытоугольной глаукоме (ПОУГ)* была изучена в региональном глаукомном центре Приморской краевой больницы № 1 г. Владивостока при участии авторов настоящей монографии (Мельников и др., 2003). Гидролизат получали 50 пациентов (27 женщин и 23 мужчины) в возрасте от 42 до 72 лет. В контрольную группу вошли 50 пациентов с ПОУГ, не получавшие гидролизат. Медикаментозное лечение двух групп пациентов включало препараты, понижающие внутриглазное давление, препараты,

---

улучшающие микроциркуляцию и оксигенацию головного мозга и сетчатки, поливитаминные препараты. Пациенты первой группы получали гидролизат перорально по 0,5 г два раза в день в течение 10–15 дней.

Анализ полученных результатов показал, что применение препарата у пациентов с ПОУГ способствовал достоверному повышению остроты зрения в 1,1 раза у 86 % больных по сравнению с контрольной группой. Сочетание препарата с обычной медикаментозной терапией сопровождалось расширением периферических границ поля зрения на 8,35 по 8 меридианам у 76 % пациентов, что в 1,2 раза больше, чем у лиц контрольной группы. У 40 % пациентов, получавших гидролизат, установлено достоверное снижение внутриглазного давления в 1,8 раза. Таким образом, использование биопрепарата при ПОУГ существенно повышает эффективность комплексной консервативной терапии этого заболевания. Кроме положительных изменений в функционировании органа зрения у пациентов отмечено улучшение самочувствия, повышение работоспособности, уменьшение головных болей и головокружений.

Полученные результаты показали целесообразность введения в курс лечения пациентов с ПОУГ гидролизат из моллюсков. Являясь активными регуляторами функций организма, аминокислоты двусторчатых моллюсков обладают разными механизмами фармакологического действия и могут быть использованы при недостатке поступления аминокислот с пищей при состояниях, сопровождающихся формированием вторичного иммунодефицита, угнетением процессов кроветворения и явлениями гипоксии, при исходной гиперактивации системы перекисного окисления липидов.

### *Влияние ГМ на регенеративные процессы в гнойной ране*

Разработка новых биосовместимых и биodeградируемых материалов для эффективной регенерации тканей не теряет своей актуальности, несмотря на широкий арсенал используемых в медицине перевязочных средств, и в частности в восстановительной и реконструктивной хирургии при лечении дефектов покровных тканей, вызванных различными повреждениями (механические травмы, ожоги и др.). В настоящее время такие биоматериалы разрабатываются на

---

основе биodeградируемых и биосовместимых с организмом полимеров: альгината, хитозана, коллагена, желатина, полиоксибутиратов и их сополимеров, которые также являются эффективными биостимуляторами, исключая при этом иммунологическое отторжение (Alsarra, 2009). Анализ зарубежного и российского рынков свидетельствует о наличии большого ассортимента раневых покрытий, среди которых – покрытия на основе альгината и хитозана, в том числе содержащие биологически активные компоненты различной химической природы (антибиотики, антисептики, антиоксиданты, ферменты, факторы роста, серебро, пчелиный воск и др.). Покрытий, в состав которых помимо вышеперечисленных входили бы биологически активные вещества (БАВ) из морских гидробионтов, среди используемых на практике нами не обнаружено, хотя во всем мире проводятся интенсивные исследования в этом направлении (Alsarra, 2009; Omidian, Park, 2010).

Несмотря на успехи современной медицины, проблема лечения гнойных ран еще далека от своего решения. В настоящее время в общей структуре хирургических заболеваний хирургическая инфекция наблюдается у 35–45 % больных и протекает в виде острых и хронических болезней или нагноения послеоперационных и посттравматических ран. Улучшение результатов лечения больных с гнойно-воспалительными процессами может быть связано с развитием и совершенствованием методов воздействия на местные воспалительно-регенеративные реакции, которые позволяют ускорить очищение ран от гнойно-некротических тканей и повысить регенеративный потенциал. Центральным звеном этого подхода является коррекция иммунных нарушений как на системном, так и на местном уровнях. В связи с этим для коррекции иммунных нарушений при гнойно-воспалительных процессах был использован гель хитозановый с гидролизатом из моллюсков. Под наблюдением были 94 больных в возрасте от 18 до 60 лет с гнойно-воспалительными процессами мягких тканей (Якушин и др., 2012). Об активизации процессов регенерации на фоне применения хитозанового геля с гидролизатом свидетельствовало выполнение раны грануляциями на 2 сут быстрее по сравнению с контролем (левомеколь), их лучшее «качество» (мелко- и среднезернистые, красные). С 7-х суток наблюдения были отмечены более быстрые темпы эпителизации ран в опытной группе.

Одновременно происходила нормализация фагоцитарной и бактерицидной активности нейтрофилов периферической крови, уменьшение явлений эндогенной интоксикации, что может быть связано как с оптимизацией течения раневого процесса, так и с резорбтивным действием биологически активных компонентов геля.

Таким образом, топическое применение иммуностропного и антиоксидантного препарата перспективно с позиции преодоления резистентности патогенной микрофлоры по отношению к антибактериальным и антисептическим препаратам, в то же время оно позволяет уменьшить степень вторичного (воспалительного) повреждения окружающих рану тканей и улучшить результаты лечения пациентов с гнойными ранами мягких тканей.

Нами разработан новый гель на основе хитозана и альгината кальция, содержащий гидролизат из двустворчатых моллюсков (ГЛ), обеспечивающий комплексное терапевтическое действие на раневой процесс (Кузнецова и др., 2015). Результаты патоморфологических исследований подтвердили эффективность геля: у животных, в комплекс лечения которых был включен гель, ускорялось развитие регенераторных процессов по сравнению с контролем (Табл. 4).

Таблица 4

**Ранозаживляющая активность геля с гидролизатом из двустворчатых моллюсков**

Группы животных	Показатель заживления ожоговой раны, %		
	3 сутки	7 сутки	сутки
1. Контроль (без лечения)	21,4 ± 9,6	49,3 ± 4,18	75,7 ± 6,12
2. Контроль (заявляемый гель без гидролизата из двустворчатых моллюсков)	23,4 ± 7,3 p 2-1 = 0,612	54,5 ± 7,96 p 2-1 = 0,223	81,3 ± 7,29 p 2-1 = 0,226
3. Контроль (мазь «Левомеколь»)	20,7 ± 7,5 p 3-1 = 0,641 p 3-2 = 0,967	57,4 ± 15,3 p 3-1 = 0,028 p 3-2 = 0,235	78,9 ± 6,2 p 3-1 = 0,971 p 3-2 = 0,765
4. Опыт (гель, содержащий гидролизат из двустворчатых моллюсков)	40,0 ± 14,4 p 4-1 = 0,043 p 4-2 = 0,043 p 4-3 = 0,029	73,1 ± 6,1 p 4-1 = 0,000 p 4-2 = 0,003 p 4-3 = 0,004	84,3 ± 3,01 p 4-1 = 0,021 p 4-2 = 0,411 p 4-3 = 0,114

*Примечание.* Показатели  $M \pm m$ ;  $n = 6$ ; использовали критерий Манна-Уитни для независимых малых выборок.

Приведенные материалы свидетельствуют о высокой физиологической активности гидролизата из двустворчатых и головоногих моллюсков, модулирующего показатели врожденного и адаптивного клеточного и гуморального иммунитета в зависимости от исходного уровня, восполняющего недостаток аминокислот в организме, повышающего сопротивляемость организма к действию неблагоприятных факторов окружающей среды и болезнетворных микроорганизмов, оказывающего антиоксидантный эффект, обладающего регенерирующим действием на кроветворение, способствующего нормальному функционированию сетчатки глаза, оказывающего регенерирующее действие в раневом процессе и являющегося средством защиты от холодового воздействия. Кроме того, этот биопрепарат оказывает положительное влияние на течение и исход острой лучевой болезни, что установлено в экспериментах на облученных мышах.



---

## ГЛАВА 2

### БАД К ПИЩЕ НА ОСНОВЕ ГИДРОЛИЗАТОВ ГОНАД МОРСКИХ ОРГАНИЗМОВ

Во всем мире растет интерес к созданию лекарственных форм нуклеозидов и нуклеотидов, являющихся эффективными средствами метаболической терапии. Многообразие функций нуклеотидных препаратов позволяет считать их универсальными биомолекулами, играющими фундаментальную роль в биологическом мире. Нуклеиновые кислоты – один из важнейших компонентов иммунологического и интегрального гомеостаза организма. Интерес к этим биополимерам как к основе для создания лекарственных средств не угасает уже более столетия.

Нуклеиновые кислоты открыты в 1868 г. швейцарским биохимиком И. Ф. Мишером, который выделил их из ядер клеточных элементов гноя, взятого с перевязочных материалов в хирургическом отделении. В дальнейшем он стал получать это вещество из молок лососей. Молоки рейнского лосося оказались очень богаты нуклеиновыми кислотами и особыми белками – протаминами. С тех пор молоки лососевых рыб являются традиционным источником нуклеиновых кислот и протаминов во многих исследованиях.

Позже было показано, что нуклеиновая кислота обладает выраженным бактерицидным действием, эффективна при лечении волчанки, рожи, суставного ревматизма, брюшного тифа, легочного и костного туберкулеза, сифилиса, лучевой болезни, агранулоцитоза, холеры, сибирской язвы, стафилококковой и стрептококковой инфекций, в акушерской и хирургической практике и пр. В начале XX столетия были сделаны попытки раскрыть механизм действия нуклеиновых кислот. Было замечено, что разные нуклеиновые кислоты значительно различаются по физико-химическим и биологическим свойствам.

С 70-х годов XX в. самым перспективным источником ДНК стали считать молоки различных видов рыб – осетровых, лососевых, сель-

---

ди, карпа. Наиболее эффективным фармакологическим действием обладают нуклеопротеиды ДНК молок осетровых и лососевых рыб. Их белки специфического состава – протамины (сальмины) – в отличие от белков других рыб и беспозвоночных (гистонов) обладают собственной высокой биологической активностью. К настоящему времени на основе низкомолекулярной ДНК (нДНК) разработаны лекарственные препараты из молок осетровых и лососевых рыб – *деринат*, *ферровир*, *натрия дезоксирибонуклеат*, *дезоксинат*. Из спермы осетровых рыб получен *натрия нуклеоспермат*. На основе ДНК молок форели получен плацентекс-интегро. Особенно широко применяется деринат (Каплина, Вайнберг, 2007).

Известны БАД к пище, в состав которых входят нуклеиновые кислоты. К ним относятся *биофизим* (высокоочищенная ДНК молок лососевых рыб с ферментным лизатом бифидобактерий), мидивирин (фрагментированная ДНК лососевых рыб и комплекс аминокислот из моллюсков), ДНКaС и ДНКaВИТ (комплекс ДНК с витаминами) и другие.

Появляется все больше рецептур молочных и мясных продуктов функционального питания, а также соков и хлебобулочных изделий, обогащенных ДНК (Беседнова, Эпштейн, 2010).

### Получение гидролизатов из молок лососевых рыб

Ограничением для введения ДНК в состав различных БАД к пище, пищевых и косметических средств ранее была ее слабая растворимость (Касьяненко, Пивненко, 1999).

В дальнейшем был создан метод обработки молок, направленный на получение растворимых компонентов, который основан на применении ферментативного гидролиза (Позднякова и др., 2004). Гидролизат, полученный из молок лососевых этим способом, содержал 30–50 % свободных аминокислот (САК), 12–18 % низкомолекулярных белков и пептидов и 20–22 % смеси олигонуклеотидов (6–68 кДа) с низкомолекулярными нуклеиновыми кислотами (300–500 кДа). Этот гидролизат хорошо растворим в водной среде, что позволяет повысить его биологическую доступность и значительно расширить сферу применения.

Для разработки метода получения гидролизатов молок (ГМ) проанализированы гонады различных гидробионтов, и по содержанию

в них ДНК выделены наиболее перспективные объекты. Исследовали также активность эндогенных ферментов (протеиназ и нуклеаз), влияющих на состав и, вероятно, биологическую активность продуктов гидролиза нуклеинового материала.

К наиболее перспективным отнесены объекты, в гонадах которых содержание ДНК составило не менее 4,5 % (горбуша, кета, омуль, сельдь). Перспективными признаны виды с содержанием ДНК в гонадах 3–4,5 %, неперспективными – осьминог, акула-катран, макрурус (менее 3 %).

В условиях ферментативного гидролиза молок лососей и сельди уже на первой стадии процесса – гомогенизации – происходило образование некоторого количества низкомолекулярных компонентов нуклеиновых кислот, включающих от 2 до 20 мономеров, чего не наблюдалось при получении гидролизатов из молок минтая (Табл. 5).

Определение олигонуклеотидов проводили с помощью ионообменной хроматографии на колонке с DEAE Toyopearl («ToyoSoda», Япония) по методу Томлинсона–Тенера. Ферментативный гидролизат наносили на колонку с DEAE-Toyopearl, уравновешенную 0,01 М трис-НСl буфером, рН 7,5, в присутствии 7 М мочевины. Элюцию проводили в градиенте 0–0,3 М NaCl для десорбции высокомолекулярных фрагментов нуклеиновых кислот (Позднякова и др., 2003).

Таблица 5

Изменение нуклеотидного состава молок под действием эндогенных и экзогенных дезоксирибонуклеаз

Объект	Нуклеотидный состав	До внесения ферментов	После внесения ферментов	Эндонуклеазная активность в молоках, Е/г
Горбуша	Мономеры	-	-	63,0 ±
	Ди-, тетрамеры	+	+++	
	16–20-меры	++	+++	
	>50	+++	+	
Минтай	Мономеры	-	-	0,0
	Ди-, тетрамеры	-	-	
	16–20-меры	-	-	
	>50	+++	+++	

Примечание. Прочерк – отсутствуют; +++ – максимальное значение.

Даже при добавлении к гомогенизированным молокам минтая экзогенных дезоксирибонуклеаз накопления низкомолекулярных компонентов не происходило, в то время как в случае молок горбуши имело место накопление большого количества олигонуклеотидов. Причиной такого явления могло быть различие в составе нуклеопротеидов молок минтая и лосося. Известно, что в комплекс нуклеопротеидов молок лосося входят протамины, в то время как в ткани молок минтая обнаружены гистоны, которые имеют более сложную структуру. Другое объяснение отсутствия накопления низкомолекулярных компонентов в молоках минтая можно найти в различии активности эндогенных ферментов молок рыб, проявляющих свое действие на первых стадиях получения препаратов и иницирующих процесс гидролиза. В итоге конечный состав препаратов, получаемых из молок различных видов гидробионтов, зависел от структуры нуклеопротеидов и активности эндогенных ферментов.

Таким образом, для получения препаратов, содержащих нуклеиновые кислоты и их производные, необходимо учитывать не только общее содержание ДНК, но также состав нуклеопротеидов и активность тканевых ферментов, которые во многом определяют содержание и состав конечных продуктов, а также влияют на скорость протекания ферментативного гидролиза (Позднякова и др., 2003).

Установлены различия в молекулярном составе полинуклеотидов в препаратах ДНК, полученных из мужских гонад горбуши, минтая, сельди и гребешка (рис. 1). ДНК из молок горбуши содержала одну фракцию с молекулярной массой 302 кДа. По два фрагмента обнаружены в ДНК из молок сельди (17 и 312 кДа), минтая (550 и 650 кДа) и гребешка (300 и 500 кДа).

На следующей стадии процесса при внесении экзогенных нуклеаз (из гепатопанкреаса краба) ДНК в молоках сельди деполимеризовалась до олигонуклеотидов с молекулярной массой 6, 10 и 16 кДа. В тех же условиях в гидролизате молок горбуши образовывались как олигонуклеотиды (6, 41, 68 кДа), так и низкомолекулярные нуклеиновые кислоты (302, 306, 320 кДа). При обработке молок минтая и гребешка ДНК гидролизовалась в незначительной степени. Отсутствие высокомолекулярных компонентов в гидролизате молок сельди, вероятно, связано с высокой эндогенной активностью содержащихся в них нуклеаз (см. рис. 1).

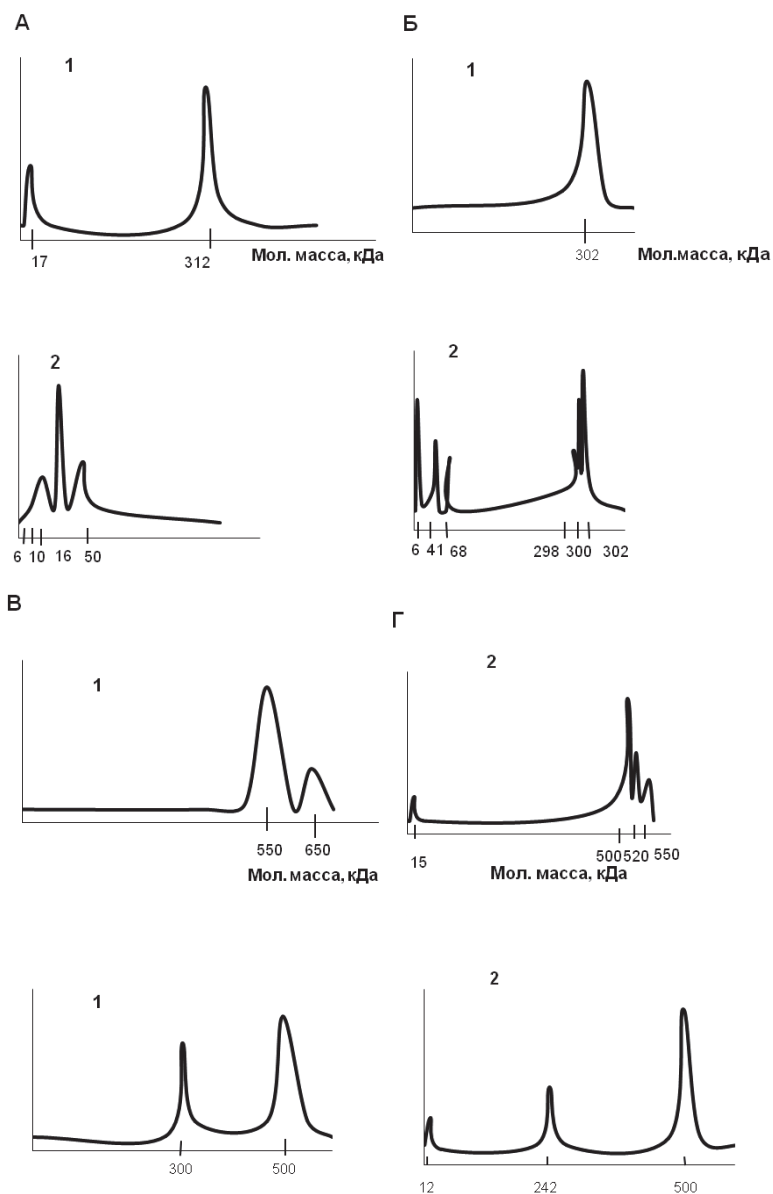


Рис. 1. Денситограммы фракций препаратов из молок гидробионтов после электрофоретического разделения. А – сельдь, Б – горбуша, В – минтай, Г – гребешок, 1 – нуклеопротеидные комплексы, 2 – гидролизаты

Сопоставление ранее полученных данных о биологической активности препаратов ДНК различных видов рыб (Беседнова, Эпштейн, 2010) позволило предположить, что она может быть связана со степенью полимерности ДНК. Например, употребление БАД на основе ДНК лососей (300 кДа) повышало физическую и умственную работоспособность человека, при использовании ДНК минтая (более 500 кДа) подобный эффект отсутствовал (Гуляков и др., 2004).

Разделение нуклеиновых кислот методом электрофореза показало, что при отсутствии активности эндогенных ферментов степень гидролиза нуклеопротеидов даже с участием экзогенных ферментов была низкой.

Таким образом, эндогенные нуклеазы и протеазы молок гидробионтов инициируют процесс гидролиза нуклеиновых кислот и облегчают доступность субстрата (ДНК) для экзогенных ферментных препаратов. Полученные результаты позволяют предполагать взаимосвязь активности эндогенных нуклеаз в молоках гидробионтов, молекулярной массы продуктов ферментативного гидролиза нуклеиновых кислот и биологической активности препаратов на их основе.

БАД к пище из молок лососей является биопрепаратом комплексного действия, и важную роль в нем играют свободные аминокислоты, образующиеся в процессе протеолиза (Табл. 6). Количественно преобладают лизин и аргинин, источником которых служат протамины. Содержание таурина также достаточно велико.

Таблица 6

Состав свободных аминокислот в препарате из молок лососей

Аминокислоты	% сухой массы
Таурин	4,7
Аспарагиновая кислота	2,4
Треонин	5,8
Серин	4,2
Глутаминовая кислота	6,6
Глицин	3,4
Аланин	6,4
Цистеин	0,5
Валин	4,3
Метионин	2,4

Окончание табл. 6

Аминокислоты	% сухой массы
Изолейцин	3,3
Лейцин	6,4
Тирозин	2,3
Фенилаланин	2,9
Лизин	8,5
Гистидин	1,6
Аргинин	8,0
Пролин	2,6
Триптофан	1,6

Аминокислоты в этом препарате способны, как и аминокислоты гидролизатов моллюсков, оказывать антиоксидантные эффекты и служить источником незаменимых для организма компонентов.

### **Экспериментальное обоснование возможности применения низкомолекулярной ДНК (нДНК) из молок лососевых рыб в качестве средства сопровождения базисной терапии при различной патологии**

#### *Токсичность и безвредность нДНК*

Опыты по определению острой токсичности на мышах обоего пола массой 16–18 г показали, что ЛД<sub>50</sub> нДНК составила 2820 ± 85 мг/кг. Это позволило отнести данный биопрепарат по токсичности к 3-му классу (умеренно токсичных) веществ. Лечебная доза – 20 мг/кг, т.е токсичность более чем в 100 раз меньше, что позволяет считать нДНК безопасной при пероральном применении.

Хроническая токсичность нДНК исследована на крысах в соответствии с международным стандартом в Институте питания РАМН (Беседнова, Эпштейн, 2010). Установлено, что ДНК в дозе, превышающей десятикратную рекомендацию, не оказывает отрицательного влияния на здоровье крыс, получавших биопрепарат в течение двух месяцев.

### *Действие нДНК и олигонуклеотидов на иммунную систему*

Долгое время существовало мнение, что нуклеиновые кислоты не оказывают заметного влияния на функционирование иммунной системы позвоночных (Рыкова и др., 2001). В дальнейшем это утверждение было пересмотрено, и бактериальную ДНК стали считать одной из наиболее иммуногенных молекул природного происхождения, «золотым стандартом адъювантов» (Krieg, 2007).

Иммуностимулирующие свойства ДНК эукариот за рубежом стали изучать позже, чем ДНК прокариот, и менее интенсивно. В России в 80–90-х годах XX в. исследования ДНК из молок осетровых и лососевых рыб стали развиваться достаточно интенсивно (Вайнберг и др., 1982; Беседнова и др., 1999; Каплина, 2000). По данным Ю.И. Вайнберга с соавторами ДНК осетровых рыб обладает иммуностимулирующими свойствами, если ее масса не превышает 500 кДа, что обеспечивает молекулам проникновение в клетку.

ДНК из молок лососей оказывает стимулирующее действие на факторы иммунитета. Это биологически активное вещество усиливает гуморальный иммунный ответ, оказывая воздействие как на индуктивную, так и на продуктивную фазы антителообразования. ДНК корригирует иммунодефицитное состояние, умеренно повышая уровень гуморального иммунного ответа на корпускулярный антиген – эритроциты барана в широком диапазоне доз. Более эффективно ДНК действует на гуморальный иммунитет при подкожном введении. При пероральном употреблении наблюдается умеренное повышение показателей, что является положительным фактором, если учесть возможность бесконтрольного применения населением биологически активных добавок к пище на основе ДНК.

Низкомолекулярная ДНК оказывает дозозависимое действие на реакции клеточного иммунитета у иммунокомпетентных и иммунокомпрометированных животных, стимулирует спонтанную и индуцированную митогеном пролиферацию Т-лимфоцитов, усиливает реакцию ГЗТ в индуктивной фазе иммунного ответа.

В действии низкомолекулярной ДНК доминирует способность стимулировать продукцию провоспалительных цитокинов и цитокинов, обеспечивающих иммунный ответ по Th1-клеточному типу, что обеспечивает повышение показателей врожденного иммунитета.

---

ДНК усиливает поглотительную, бактерицидную и синтетическую активность макрофагов и полиморфноядерных лейкоцитов, обладает антиоксидантной активностью.

Главным фармакологическим свойством нуклеиновых кислот является стимуляция лейкопоэза, процессов регенерации и репарации при разных типах повреждений, функциональной активности практически всех клеток иммунной системы. Механизм их действия связан с тем, что компоненты нуклеиновых кислот участвуют практически во всех адаптационных неспецифических защитно-приспособительных реакциях организма на раздражители.

### *Эффективность нДНК при экспериментальной острой лучевой болезни*

Повсеместное распространение ядерных технологий влечет за собой неизбежное расширение круга лиц, подвергающихся неблагоприятному воздействию радиационных факторов. К группам высокого радиационного риска относят персонал ремонтных подразделений атомных электростанций, рабочих урановых рудников и предприятий по переработке урановых руд, врачей – рентгенологов, радиологов и т.д. Сюда же можно отнести больных с онкологической патологией. Ионизирующее излучение вызывает в организме каскад патологических реакций: снижение резистентности к инфекционным агентам, уменьшение содержания лимфоцитов (в большей степени, чем других клеток крови) и в конечном итоге формирование вторичного иммунодефицита панцитопенического типа.

Имунодефицит развивается почти немедленно после общего внешнего облучения организма. Действие радиации на иммунную систему обусловлено повреждением естественных барьеров, отделяющих внутреннюю среду организма от внешней, что приводит к усилению биологической агрессии. Имеет значение также избыточное повреждение лимфоцитов и всех делящихся клеток, вовлекаемых в иммунный ответ, что делает организм беззащитным. Острая лучевая болезнь (ОЛБ) – это вторичный временный иммунодефицит панцитопенического типа. Характерными последствиями ее являются длительное сохранение повреждений в отдельных звеньях системы иммунитета и возникновение отдаленных последствий в форме радиационного канцерогенеза и ускоренного старения. На-

---

иболее часто в этот период наблюдаются нарушения Т-клеточного звена и снижение уровня нормальных киллеров, ответственных за состояние противоопухолевого и противовирусного иммунитета.

Для профилактики лучевых поражений и лечения разных форм, стадий и проявлений лучевой болезни используют большое количество лекарственных средств – так называемых радиопротекторов.

ДНК, а также полинуклеотиды и нуклеозиды в качестве радиопротектора используют больше полувека. Источниками для получения ДНК служили печень, тимус, селезенка животных, молоки рыб (сельди, осетра). Радиопротекторное действие нуклеиновых кислот поставило вопрос о возможном иммунологическом механизме реализации этого эффекта.

В лаборатории иммунологии НИИЭМ им Г.П. Сомова (Потапова, 2005; Федянина, 2007; Беседнова, Эпштейн, 2010) для лечения ОЛБ в эксперименте на мышах использован ГМ лососевых рыб, описанный выше.

### *Влияние нДНК из молок лососевых рыб на выживаемость и среднюю продолжительность жизни облученных животных*

Выживание животного при воздействии на него ионизирующей радиации в костномозговом диапазоне доз создает четкую модель радиорезистентного состояния организма. Поэтому заключение о радиозащитном действии биологически активных веществ может быть сделано в том числе на основании оценки его влияния на выживаемость и среднюю продолжительность жизни (СПЖ) животного при облучении в диапазоне доз, вызывающих костномозговую синдром ОЛБ.

При однократном введении нДНК в различных дозах сублетально облученным мышам установлено, что профилактического (за сутки до облучения) защитного эффекта не было. Однократное введение нДНК в качестве лечебного средства при ОЛБ (через сутки после облучения) показало лучшие результаты. При этом наиболее эффективным было введение нДНК в дозе 10 мг/кг. В этом случае выживаемость животных более чем в 2 раза превышала контрольный показатель –  $35,0 \pm 10,9\%$  ( $p = 0,01$ ) и  $15,0 \pm 8,2\%$  соответственно (Федянина, 2007; Беседнова, Эпштейн, 2010).

В других экспериментах исследовали действие наиболее эффективной дозы нДНК (10 мг/кг) в зависимости от способа ее введения курсом на протяжении 6 дней – подкожно и перорально, по профилактической и лечебной схемам. Лучшие результаты также были зафиксированы при введении ДНК по лечебной схеме, как при подкожном, так и при пероральном применении. Обращает на себя внимание тот факт, что выживаемость мышей увеличивалась по сравнению с контролем ( $15,0 \pm 8,2\%$ ) в 3 раза ( $45,0 \pm 11,4\%$ ,  $p < 0,01$ ) при подкожном введении нДНК; при пероральном введении выживаемость увеличивалась в 3,5 раза ( $35,0 \pm 10,9\%$  в опыте и  $10,0 \pm 8,1\%$  в контроле,  $p = 0,05$ ). нДНК также увеличивала среднюю продолжительность жизни облученных мышей при введении ее по лечебной схеме в дозе 10 мг/кг (в опыте –  $18,8 \pm 2,1\%$ , в контроле –  $12,1 \pm 2,0$ ,  $p = 0,01$ ). Введение ДНК в дозе 10 мг/кг курсом 6 дней, подкожно, после облучения, по лечебной схеме также способствовало выраженному увеличению СПЖ животных –  $21,5 \pm 1,9$  в группах, получавших препарат, при  $10,8 \pm 2,0$  в контроле,  $p < 0,001$ . Профилактическое применение ДНК было неэффективным (Федянина, 2007).

Применение ДНК в дозе 10 мг/кг при пероральном лечебном введении в большей степени способствовало увеличению СПЖ мышей, чем при профилактическом введении, хотя и в том и в другом случаях разница по сравнению с контролем была достоверной –  $22,1 \pm 1,8$ ,  $p < 0,001$  и  $20,6 \pm 2,2$ ,  $p < 0,01$  (в контроле –  $10,0 \pm 1,8$ ) соответственно.

Таким образом, применение ДНК из молок лососевых рыб при костномозговой стадии острой лучевой болезни у мышей повышает уровень их выживаемости и увеличивает среднюю продолжительность жизни. В большей степени выражен эффект ДНК при лечебной схеме ее введения. По-видимому, влияние нДНК на выживаемость и среднюю продолжительность жизни мышей обусловлено стимулирующим действием на процессы репарации на клеточном и регенерации – на тканевом уровне. Природные стимуляторы радиорезистентности, к которым относится нДНК из молок лососевых рыб, воздействуют на регуляторные системы облученных, мобилизуют эндогенный фон радиорезистентности, врожденный и адаптивный иммунитет. Такие биопрепараты мало- или нетоксичны и могут быть использованы как пищевые вещества.

### *Влияние нДНК на кроветворение при острой лучевой болезни*

Клетки, формирующие колонии в селезенке облученных мышей, являются эквивалентами стволовых кроветворных клеток. Они наделены огромным пролиферативным потенциалом и способны к самоподдержанию на протяжении всей жизни организма. За счет стволовых клеток происходит постоянное обновление кроветворной и лимфоидной ткани. Как показали наши эксперименты (Потапова и др., 2004; Беседнова, Эпштейн, 2010), гидролизат из молок увеличивал число эндогенных (в контроле –  $8,9 \pm 1,7$ , в опыте –  $21,9 \pm 3,3$ ) и экзогенных селезеночных колоний. В последнем случае статистически достоверные различия с контролем отмечены только в экспериментах *in vivo* (в контроле  $16,3 \pm 0,8$ , в опыте –  $19,9 \pm 1,5$ ). Наиболее эффективной дозой является 10 мг/кг. Стимулирующий эффект в большей степени выражен при применении лечебной схемы. Кроме того, увеличивалось количество КОЕ-ГЭММ (гранулоцитарно-эритроидно-моноцитарно-макрофагальные колониеобразующие единицы) *in vitro* ( $1,3 \pm 0,5$ , в контроле – 0) и *in vivo* ( $2,3 \pm 0,3$ , в контроле –  $0,8 \pm 0,5$ ) (Потапова и др., 2004).

Таким образом, взаимодействие препарата из молок рыб с клетками костного мозга вызывает умеренную активацию стволовых кроветворных клеток, обеспечивая усиление процессов пролиферации и дифференцировки гемопоэтических клеток-предшественников.

Показателями воздействия на организм ионизирующего излучения служат изменения в составе крови, клеточности костного мозга, а также массе и клеточности лимфоидных органов. Пероральное введение препарата через 30 мин после облучения приводило к более раннему и полному восстановлению кроветворения у животных, получивших препарат, чем у контрольных животных. Это касалось массы тела мышей, массы селезенки (на 9-й день в контроле она была равна  $38 \pm 2,5$  мг, в опыте –  $58,6 \pm 5,0$ ; на 14-й день –  $121 \pm 9,7$  мг и  $149,8 \pm 14,8$  мг, соответственно), процесс восстановления клеточности костного мозга у опытных мышей также был более быстрым. На 9–14-е сутки наблюдали рост этого показателя в контроле на 24,7%, в опыте – до 60,8% от исходного уровня. Количество ядросодержащих клеток (ЯСК) в селезенке на 3-и сутки после облучения в контроле составило 3,8% от исходного уровня, в опыте – 10,5%,

---

на 9-е сутки – 11,1 % и 157,2 %, на 14-й день – 10,8 % и 138 % соответственно. Близкие значения отмечены для показателя клеточности костного мозга (на 23-е сутки количество тимоцитов у опытных животных составило 42,1 % при 27,1 % в контроле).

Представленные результаты свидетельствуют о том, что введение мышам препарата через 30 мин после облучения способствует более полному и раннему восстановлению кроветворения, массы и клеточности лимфоидных органов.

#### *Противоопухолевая активность нДНК на модели карциномы Льюиса*

В предварительных экспериментах установлено, что нДНК, полученная из молок лососевых рыб, не обладает цитотоксическим действием на клетки асцитной карциномы Льюиса в широком диапазоне доз (Федянина, 2007; Беседнова, Эпштейн, 2010).

Максимальный и статистически достоверный противоопухолевый эффект с увеличением средней продолжительности жизни животных на 37,2 % ( $15,7 \pm 1,2$  дня) был достигнут при введении нДНК в дозе 10 мг/кг по профилактической схеме. При остальных схемах введения средняя продолжительность жизни мышей увеличивалась не столь значительно.

Применение в экспериментах комплексов ДНК с различными химиопрепаратами достаточно широко представлено в литературе. Например, применение дерината с адриамицином (противоопухолевый препарат) на крысах с четырьмя различными по гистогенезу перевиваемыми штаммами опухолей (саркомой 45, саркомой М-1, карциносаркомой Уокер 256, альвеолярным раком печени РС-1) приводило к снижению скорости их роста на  $18,6 \pm 2,5$  %. Совместное с деринатом введение по различным схемам усиливает противоопухолевый эффект адриамицина, что выражалось в уменьшении массы опухоли, торможении ее роста, увеличении средней продолжительности жизни животных – опухоленосителей (Каплина, 2000).

#### *Антиинфекционное действие нДНК*

Механизмы антиинфекционного действия низкомолекулярной ДНК из различных источников в значительной степени связаны с активацией врожденного иммунитета, а также с тем, что она на-

---

правляет иммунный ответ по пути Th1-типа. Исследовали влияние ДНК из молок лососевых рыб на течение и исход экспериментального инфекционного процесса, вызванного *E. coli* (Беседнова и др., 1999). Известно, что одним из основных критериев биологической активности веществ является суммарный эффект, складывающийся из действия многочисленных факторов, обеспечивающих защиту организма от возбудителя, который выражается в способности противостоять развитию инфекционного процесса. В контрольной группе мышей, не получавших нДНК (доза биопрепарата составляла 5 мг/кг), погибли все зараженные животные. Наиболее выраженный защитный эффект отмечен при однократном пероральном введении ДНК за сутки до заражения ( $65 \pm 2,9$  %), а также при двукратном введении за сутки до заражения ( $60,0 \pm 3,4$  %). Многократное введение нДНК не улучшало показателей протективной активности биопрепарата. Инфицирование мышей в таких же условиях *Pseudomonas aeruginosa* сопровождалось гибелью 100 % контрольных животных и защитой 38,2 % мышей, получивших перорально нДНК. Гидролизат молок лососевых рыб в дозе 5 мг/кг усиливал фагоцитарную активность перитонеальных макрофагов мышей по отношению к *E. coli in vivo*. Таким образом, нДНК можно использовать в качестве средства сопровождения базисной терапии при инфекциях с фагоцитарным механизмом защиты.

#### *Антитоксическое действие нДНК*

Инфекционный токсико-аллергический синдром является одним из ведущих в патогенезе многих инфекционных заболеваний. Токсины как факторы патогенности бактерий наряду с адгезинами, инвазинами и биомолекулами, обеспечивающими устойчивость микроорганизмов к действию защитных факторов иммунной системы теплокровных, играют значительную роль в развитии и исходе инфекционного процесса. Еще в 70-х годах прошлого века было показано, что препараты нуклеиновых кислот различного происхождения повышают антитоксическую резистентность организма. Так, ДНК из сельди, а также дрожжевая ДНК в экспериментах на морских свинках оказывали протективное действие при дифтерийной интоксикации. Результаты исследования с помощью реакции преципитации свидетельствовали о связывании токсина с препаратами ДНК и РНК

---

и о специфическом взаимодействии связанного токсина с дифтерийным анатоксином (Ходырев, 1974).

В лаборатории молекулярных основ патогенности НИИЭМ им. Г. П. Сомова проведены исследования антитоксического действия нДНК из молок лососевых рыб на модели интоксикации, обусловленной термолабильным и термостабильным токсинами *Y. pseudotuberculosis* (Павлинич, 2006). Автор использовал профилактическую и лечебную схемы применения нДНК в экспериментах *in vitro* и *in vivo*. Профилактическое введение ДНК мышам *per os* предотвращало летальное действие обоих токсинов, которые вводили внутривентриально. В группах мышей, которые получали ДНК за сутки до введения токсинов и одновременно с их введением, выживали 100% животных при гибели всех мышей контрольной группы. В случае введения ДНК через 1 и 3 ч от момента введения токсина выживали от 43 до 90% животных. Под действием нДНК возрастала резистентность нейтрофилов перитонеальной полости к токсинам возбудителя псевдотуберкулеза. Поскольку нДНК повышает фагоцитарную активность и макрофагов, можно полагать, что макрофаги и нейтрофилы играют роль в защите организма от воздействия токсина.

### **Исследование клинической эффективности нДНК в качестве средства сопровождения базисной терапии при различных патологических процессах**

#### *Действие нДНК на центральную нервную систему*

Согласно исследованиям (применен близнецовый метод), проведенным в Институте физиологии им. И. П. Павлова РАН, гидролизат молок лососевых рыб оказывал неспецифический стимулирующий и тонизирующий эффекты на организм человека, в первую очередь проявлявшиеся в увеличении физической работоспособности (по данным Гарвардского степ-теста). Тонизирующее влияние проявлялось в оптимизации процессов биоэлектрической активности головного мозга (данные электроэнцефалографии), снижении астенической симптоматики. У близнецов, принимавших нДНК, наблюдалась оптимизация корково-подкорковых отношений ЦНС,

---

которые выражались в увеличении альфа-индекса, снижении индексов бета-активности и медленных волн. Результаты исследования показали, что нДНК повышает эффективность протекания процессов высшей нервной деятельности, улучшает функционирование сосудистой системы, что создает оптимальные условия для значительного увеличения физической работоспособности человека (Гуляков, 2004).

#### *Влияние нДНК на состояние иммунной и антиоксидантной систем у пожилых людей*

Иммунологические процессы играют значительную роль в процессе старения организма. Для пожилого и старческого возраста характерно снижение противомикробного иммунитета, противовирусной и противоопухолевой защиты, Т-клеточного звена иммунитета (Ярилин, 2003), гуморального иммунного ответа как на аутологичные, так и на экзогенные антигены, изменение рецепторного аппарата иммунокомпетентных клеток и соотношения клеточных субпопуляций. Накопление повреждений в клетках и скорость старения зависят также от соотношения процессов образования активных форм кислорода (АФК) и их обезвреживания ферментативной системой антиоксидантной защиты. АФК повреждают макромолекулы, что приводит к мутациям, нестабильности генома в целом и развитию ряда возрастных патологий, таких как онкологические и сердечно-сосудистые заболевания, возрастная иммунодепрессия, дисфункция мозга, развитие катаракты и др. (Ланкин, 2001).

В связи с этим применение природных иммунокорректоров и антиоксидантов является одной из наиболее актуальных проблем современной геронтологии. Использование таких биопрепаратов может способствовать разрыву патологической цепи в структуре старение–болезнь, что в свою очередь позволит уменьшить предпосылки к развитию возрастной патологии.

К числу биологически активных веществ природного происхождения, перспективных в качестве геропротекторов, относится нДНК.

Исследования при участии авторов настоящей монографии проведены на базе Седанкинского дома-интерната для ветеранов. Пожилые люди в возрасте от 67 до 87 лет получали нДНК по 50 мг 1 раз в день в течение 30 дней (Шутикова и др., 2006 а, б).



Установлено, что нДНК у пожилых людей оказывает иммуномодулирующее действие на клеточный (повышение уровня CD3<sup>+</sup>-, CD4<sup>+</sup>-, CD8<sup>+</sup>-, CD16<sup>+</sup>-лимфоцитов) и гуморальный иммунный ответ (IgG, IgA, IgM), стимулирует пролиферацию В-лимфоцитов и фагоцитарную активность нейтрофилов, увеличивает функционально-метаболические резервы нейтрофилов (Шутикова, 2009).

Положительной оценки заслуживает антиоксидантное действие нДНК у пожилых людей, позволяющее восстановить баланс между процессами перекисного окисления липидов и механизмами антиоксидантной защиты клетки.

### *Влияние нДНК на цитокиновый статус здоровых доноров*

Известно, что элементы гемопозиндуцирующего микроокружения осуществляют контроль над процессами кроветворения посредством прямых контактов с гемопоэтическими клетками и через продукцию цитокинов. К основным ранним гемопоэтическим ростовым факторам относятся ИЛ-3 и ГМ-КСФ. Низкомолекулярная ДНК оказывала модулирующее влияние на продукцию цитокинов клетками крови доноров в зависимости от их исходного уровня. В ее действии на покоящиеся клетки преобладал регуляторный эффект: исходно низкая продукция цитокинов усиливалась, исходно высокая – снижалась. В случае стимуляции клеток митогеном они отвечают на введение нДНК снижением продукции цитокинов в культурах клеток крови с высоким уровнем цитокина после стимуляции. При низких и средних концентрациях цитокинов их уровни во всех случаях возрастали. Так, в группе доноров с исходно низкими показателями нДНК способствовала значительному повышению уровня ГМ-КСФ –  $3,4 \pm 1,2$  пг/мл против  $0,5 \pm 0,1$  пг/мл; в 4 случаях из 7 превышала уровень ИЛ-3 ( $1,7 \pm 0,2$  пг/мл против  $0,4 \pm 0,1$  пг/мл). В группе доноров со средними показателями уровня ГМ-КСФ низкомолекулярная ДНК не вызывала достоверного изменения секреции этого цитокина ( $2,7 \pm 1,2$  пг/мл и  $3,8 \pm 0,8$  пг/мл), а также ИЛ-3 ( $2,2 \pm 0,4$  пг/мл и  $2,3 \pm 0,6$ , соответственно). В группе доноров с высокими показателями цитокинов препарат снижал уровень ГМ-КСФ

в супернатантах крови доноров с  $17,8 \pm 5,5$  пг/мл до  $4,8 \pm 0,8$  пг/мл, ИЛ – с  $12,8 \pm 6,2$  пг/мл до  $2,3 \pm 0,6$  (Федянина, 2007).

Модулирующее действие низкомолекулярная ДНК оказывала также на выработку фактора некроза опухоли (ФНО). В группе доноров с низким содержанием в крови этого цитокина его уровень повышался (с  $25,5 \pm 4,2$  пг/мл в контроле до  $84,7 \pm 13,3$  пг/мл в опыте), с высоким – снижался (с  $1168,3 \pm 262,1$  пг/мл до  $785,9 \pm 170,1$  пг/мл), а со средним – несколько повышался (с  $189,5 \pm 39,6$  пг/мл до  $234,3 \pm 75,1$  пг/мл).

БАД к пище из молотых лососей повышала уровень ИФН- $\gamma$  в крови с низкими показателями этого цитокина (в контроле –  $7,8 \pm 1,5$  пг/мл, в опыте –  $21 \pm 5,5$  пг/мл), достоверно снижала в крови с высоким содержанием ИФН- $\gamma$  (с  $62,8 \pm 15,3$  пг/мл в контроле до  $31,0 \pm 0,6$  пг/мл в опыте) и не изменяла содержания цитокина в образцах крови со средним уровнем ИФН- $\gamma$ . Поскольку БАД к пище способствовала повышению концентрации ФНО- $\alpha$  и ИФН- $\gamma$  в супернатантах крови, практически не влияя на уровень секреции ИЛ-10, можно полагать, что ее использование позволит в какой-то степени направлять развитие иммунного ответа по Th-1-пути.

Таким образом, радиозащитный эффект препарата, доказанный ранее в эксперименте, может быть не только обусловлен прямым действием на стволовые кроветворные клетки, но и опосредован влиянием последних на гемопозиндуцирующее микроокружение, которое реализуется через активацию продукции гемопоэтических ростовых факторов ИЛ-3, ГМ-КСФ и ФНО- $\alpha$ . Способность стимулировать развитие клеточного иммунного ответа может предотвращать возможность возникновения посттрансляционного дисбаланса Th1/ Th2 – дефицита Th1, проявляющегося в ослаблении противоопухолевой и противовирусной резистентности. Эти данные могут служить обоснованием применения БАД к пище из молотых лососей при костно-мозговом синдроме лучевой болезни, а также у онкологических больных, получающих радиотерапию (Федянина, 2007; Беседнова, Эпштейн, 2010).

Все вышеизложенное позволило рекомендовать нДНК как общеукрепляющую БАД к пище с мягким действием на иммунную систему и кроветворение.

---

---

### *Иммуномодулирующее действие нДНК при онкологических процессах*

В литературе достаточно много работ о противоопухолевом действии ДНК из микроорганизмов (Shimada et al., 1985; Andaloussi et al., 2006). Меньшее количество исследований проведено с препаратами, полученными из молок рыб (Каплина, 2000; Федянина, 2007).

Весьма актуальной остается проблема разработки методов и стандартов иммуносопровождения базисной терапии онкобольных, что позволит создать условия для полноценной реализации апробированных вариантов лечения и улучшит качество их жизни. В связи с этим в лаборатории иммунологии НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.П. Сомова и Приморском онкологическом центре исследована иммунологическая эффективность нДНК, поскольку, как показано выше, этот биопрепарат оказывает иммуномодулирующее действие на организм человека.

Показано, что нДНК в качестве средства сопровождения лучевой терапии у больных раком молочной железы (РМЖ) обеспечивает модулирующее действие в отношении уровня IL-3, GM-CSF, TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$ , IL-10 независимо от возраста и стадии заболевания. В большей степени и статистически достоверно нДНК корректирует уровень гемопэтического цитокина GM-CSF, повышает уровень IFN $\alpha$  и TNF $\gamma$  у пациентов с исходно низкими показателями, снижает уровень IL-10 у больных с высокими концентрациями. Одинаковая тенденция динамики цитокинов у больных контрольной и опытной групп, но большая выраженность ее у пациенток, принимавших нДНК, по-видимому, свидетельствуют о физиологической и защитной активности от ионизирующего облучения этой биологически активной добавки к пище (Федянина, 2007).

У этих же пациенток исследовали показатели крови. Анализ динамики количества лейкоцитов периферической крови за период проведения лучевой терапии показал, что значение этого показателя уменьшалось с  $(5,7 \pm 0,2) \times 10^9$  до  $(3,8 \pm 0,2) \times 10^9$ . В группе больных, получавших ДНК, снижение числа лейкоцитов было менее выраженным: с  $(5,1 \pm 0,2) \times 10^9$  на 1 сутки до  $(4,4 \pm 0,2) \times 10^9$  на 30-е сутки. Статистически значимые изменения отмечены и со стороны тромбоцитов. Содержание их в крови женщин, не получавших нДНК,

---

---

снижалось с  $(192,2 \pm 10,3) \times 10^{12}$  до  $(146,7 \pm 8,0) \times 10^{12}$ . У больных, получавших нДНК, количество тромбоцитов снижалось менее значительно: с  $(176,5 \pm 10,3) \times 10^{12}$  до  $(165 \pm 7,2) \times 10^{12}$ . Различий в содержании гемоглобина и количестве эритроцитов не было.

При использовании нДНК не установлено побочных эффектов (как немедленных, так и отсроченных) и значимых изменений биохимических показателей крови, мочи, что свидетельствует о безопасности этой БАД к пище в отношении функций печени и почек. Как нам представляется, практическое применение нДНК может найти свое место в общем арсенале современных средств иммунотерапии и иммунореабилитации онкологических больных, тем более что препараты ДНК рекомендованы практически всем больным, получающим химио- или лучевую терапию, для стимуляции гемопоза, снижения кардио- и миелотоксичности. Успех в терапии онкозаболеваний при использовании ДНК объясняют еще и ее способностью накапливаться в тканях, находящихся в критическом состоянии, и служить проводником цитостатика (Каплина, 2000).

---

---

### ГЛАВА 3

## БАД К ПИЩЕ НА ОСНОВЕ ГИДРОЛИЗАТОВ ИЗ ХРЯЩЕВОЙ ТКАНИ МОРСКИХ ОРГАНИЗМОВ

**О**стеоартроз (по международной классификации – остеоартрит) – одна из причин обращения за врачебной помощью начиная с юношеского возраста, в особенности после 45 лет и старше. Этим заболеванием страдают не менее 20% населения Земли (Зборовский, Мозговая, 2006). Число больных остеоартрозом (ОА) с годами будет только возрастать в связи с увеличением продолжительности жизни людей (Fox, Stephens, 2007). ОА в настоящее время входит в пятерку основных причин временной утраты трудоспособности, а коксартроз и гонартроз часто приводят к стойкой утрате трудоспособности.

По современным представлениям в основе развития ОА может лежать множество эндогенных и экзогенных факторов. Деструкцию хряща и развитие ОА в первую очередь связывают с профессиональной деятельностью человека, травмами суставов, нарушением обмена веществ и избыточной массой тела, а не только с возрастным изнашиванием суставов (Алексеева, Цветкова, 2009).

При ОА в патологический процесс вовлекаются гиалиновый хрящ, субхондральная кость, синовиальная оболочка и другие структуры сустава (внутрисуставные связки, суставная капсула и прилежащие к суставу мышцы и сухожилия).

Суставной хрящ состоит из плотной соединительной ткани, в которой межклеточное вещество (матрикс) преобладает над клеточным компонентом. Матрикс содержит протеогликаны и коллаген, состоящий в основном из коллагена II типа, обеспечивающего сопротивление растяжению. Клетки соединительной ткани хряща – хондроциты – продуцируют углеводно-белковые комплексы основного вещества (протеогликаны, гликозаминогликаны – ГАГ), участвуют в образовании волокнистых структур (эластин, коллаген), регулируют

---

---

ют метаболизм и структурную стабильность волокнистых элементов соединительной ткани, осуществляют эпителиально-мезенхимальное взаимодействие, поддерживают пространственную структуру соединительной ткани.

Функциональные свойства хряща, способность выдерживать значительное давление, восстановление после нагрузки обеспечивают ГАГ, ограничивающие содержание воды, а также протеогликаны и коллаген II типа. Характерным признаком деструкции хряща является уменьшение концентрации ГАГ, в результате чего сопротивление межклеточного вещества физическому воздействию снижается, и поверхность хряща становится чувствительной к повреждению.

На ранних стадиях ОА небольшое снижение содержания ГАГ восполняет повышение функциональной активности хондроцитов. При прогрессировании заболевания содержание ГАГ не нормализуется полностью, поскольку пролиферация хондроцитов становится неполноценной. Хондроцит начинает реагировать на изменение матрикса, при этом происходит синтез нефибриллярного коллагена и несвойственных хрящевой ткани протеогликанов. Утрата биомеханических свойств межклеточного вещества приводит к разволокнению и расщеплению матрикса, хрящ становится мутным, сухим, разрыхленным, появляются глубокие эрозии, распространяющиеся до кости. Хрящ теряет свои основные свойства – амортизатора давления на подлежащую ткань.

Для сохранения целостности хряща и сохранения его функций необходим постоянный синтез ГАГ, протеогликанов и коллагена в объеме, равном количеству теряемого. Однако при ОА преобладают катаболизм, дегградация компонентов матрикса, а синтетическая активность оказывается недостаточной.

Кроме дегенеративных изменений в развитии и прогрессировании остеоартроза значительную роль играет воспаление (Бадюкин, 2009). В пораженном суставе усиливается продукция провоспалительных цитокинов. IL-1 экспрессируется в пораженном остеоартрозом хряще и стимулирует выработку матриксных металлопротеиназ (стромелизина, коллагеназы, желатиназы), которые продуцируются хондроцитами в неактивной форме, но после активации способны разрушать все компоненты внеклеточного матрикса (Соловьева, 2000; Stracke et al., 2000). Кроме того, IL-1 тормозит экспрессию

---

коллагена и протеогликанов и стимулирует выработку эйкозаноидов – простагландинов и лейкотриенов. Повышенная продукция оксида азота запускает апоптоз хондроцитов, при этом поврежденные хондроциты начинают продуцировать отличные от нормальной хрящевой ткани коллаген и протеогликаны (короткий коллаген и низкомолекулярные мелкие протеогликаны). Развивается протеогликановая недостаточность матрикса, хрящевая ткань теряет гликозаминогликаны (Новиков, Новикова, 2011). Продукты деградации хряща, попадая в синовиальную жидкость, вызывают синовиальное воспаление, в результате чего снижается образование эндогенной гиалуроновой кислоты и синовиальной жидкости (Laurence et al., 2003).

Основные задачи в лечении остеоартроза – прекращение деструкции хряща, угнетение инициированных реакций воспаления, нормализация метаболических процессов в хрящевой ткани, уменьшение боли и улучшение функции сустава. В настоящее время в лечении ОА существуют два направления: быстрое уменьшение болевого синдрома и воспалительных изменений в суставах (Новиков, Новикова, 2011), а также замедление деградации компонентов хряща и прогрессирования болезни (Бадокин, 2009; Vana et al., 2006).

В контексте данных исследований нас больше интересовало второе направление – получение биопрепарата замедленного действия – хондропротектора, относящегося к структурно-модифицирующим средствам. К медленно действующим препаратам относятся глюкозамина сульфат, хондроитина сульфат, которые являются структурными аналогами глюкозаминогликанов хрящевой ткани, диацереин, гиалуронан, пиаскледин, альфлутоп, неомыляющиеся соединения авокадо и сои (Пешехонова и др., 2009; Jordan et al., 2003). Хондропротекторы являются обязательным компонентом комплексной терапии остеоартроза (Пешехонова и др., 2009; Jordan et al., 2003). Согласно рекомендациям EULAR для ОА коленных суставов, доказанным является симптоматический эффект глюкозамина сульфата, хондроитина сульфата и, возможно, их влияние на структуру болезни ((Pendleton et al., 2000). Для ОА тазобедренных суставов определены симптоматический эффект и низкая токсичность глюкозамина сульфата, хондроитина сульфата, однако выраженность их влияния на восстановление хряща недостаточная.

---

Действующим началом глюкозамина сульфата является сульфатное производное природного моноаминосахарида глюкозамина, обычного компонента ГАГ и протеогликанов в матриксе хряща и синовиальной жидкости. Глюкозамин является ключевой молекулой в синтезе ГАГ и гиалуроновой кислоты, которые в совокупности составляют протеогликаны. Одним из источников глюкозамина является хитин ракообразных. При поступлении в организм человека он хорошо всасывается в тонком кишечнике, легко проникает через биологические барьеры и быстро распределяется в тканях. Особенно хорошо он абсорбируется суставным хрящом вследствие тропизма и небольшого размера молекул, что позволяет ему встраиваться в структуры хрящевой ткани, стимулируя ее синтез и угнетая деградацию (Голубев, Кригштейн, 2005).

Преимуществами применения хондропротекторов в клинической практике являются уменьшение выраженности симптоматики артрозов (ослабление болей, улучшение функции суставов), возможность сочетать их применение с анальгетиками и нестероидными противовоспалительными препаратами, сохранение эффекта после окончания лечения, отсутствие серьезных побочных эффектов, замедление прогрессирования болезни (Новиков, Новикова, 2011). В последнее десятилетие большой интерес вызывают исследования, связанные с получением хондропротекторов из хрящевой ткани морских гидробионтов. Аргументом в пользу привлечения отходов рыбы и других гидробионтов для получения биологически активных веществ является их значительный объем и высокое содержание биологически активных веществ, особенно хондроитинсульфата, в отходах хрящевых рыб. В связи с этим для разработки способов получения гидролизатов из хрящевой ткани морских организмов нами использованы хрящевые и костистые рыбы дальневосточных морей, а также кальмары (Пивненко, Суховерхова, 2010).

Материалами исследования служили: хрящевая ткань дальневосточных рыб и головоногих моллюсков: акул *Squalus acanthias*, *Somniosus pacificus*; ската *Bathyraja aleutica*; калуги *Huso dauricus*; рыб семейства лососевых *Oncorhynchus gorbusha* (горбуши), *Oncorhynchus keta* (кеты), *Oncorhynchus kisuch* (кижуча), *Oncorhynchus nerka* (нерки), *Oncorhynchus tshawytscha* (чавычи), *Salvelinus leucomaenis* (кунджи), *Salvelinus malma* (гольца); семейст-

ва тресковых *Theragra chalcogramma* (минтая), *Gadus macrocephalus* (трески), *Eleginus gracilis* (наваги); головоногих моллюсков *Todarodes pacificus* (тихоокеанского кальмара), *Ommastrephes bartrami* (кальмара Бартрама) и *Berryteuthis magister* (командорского кальмара).

Перспективным сырьем для получения биопрепаратов признаны отходы переработки акул, скатов и осетровых рыб, имеющие высокое содержание «чистой» неминерализованной хрящевой ткани, а также костно-хрящевые отходы лососевых и тресковых рыб. Наименьшее массовое содержание хрящевой ткани характерно для кальмаров, однако этот источник практически не содержит балластных компонентов (жиров и несвойственных белков). Основными регуляторами воспаления и ангиогенеза при остеоартрозе являются тканевые ингибиторы металлопротеиназ (ТИМП), способные образовывать комплекс с неактивной формой фермента, что указывает на более сложные функции, чем простое подавление активности ферментов (Турна, 2010). Взаимосвязь между проявлением активности матриксных металлопротеиназ и их ингибиторов прослеживается при различных физиологических и патологических состояниях тканей.

Среди наиболее известных ингибиторов самым распространенным является ТИМП-1 – гликопротеин с м.м. 30 кДа, в меньших количествах встречается ТИМП-2 – негликозилированный белок с м.м. 23 кДа. Оба ингибитора легко экстрагируются из хряща (Murphy et al., 1989) и сохраняют устойчивость к действию протеолитических ферментов. Известно о высокой концентрации ТИМП в экстрактах хрящевой ткани гидробионтов, например, в хряще акул количество ингибиторов металлопротеиназ и ангиогенеза в 100 раз выше, чем в хрящевой ткани телят (Lee, Langer, 1983; Liang, Wong, 2000). Сведения об аналогичной ингибиторной активности в хряще других рыб и кальмаров отсутствуют.

Исследовали ингибиторную специфичность исходной хрящевой ткани и препаратов из нее. Влияние ингибиторов на активность ферментов устанавливали по изменению коллагено- и казеинолитической активности. Также сравнивали действие водных экстрактов хрящевой ткани, так как на примере акул известно об аналогичном действии таких экстрактов. Сравнивали ингибиторное действие препаратов на активность суммарного протеолитического препарата из гепатопанкреаса камчатского краба и коллагеназы из *Clostridium*

*histolyticum* (Суховерхова, 2006). Гепатопанкреатин содержит преимущественно сериновые протеиназы, способные расщеплять широкий спектр белковых субстратов, включая коллаген (Sakharov et al., 1992). Субстратная специфичность коллагеназы из *C. histolyticum* в целом сходна со специфичностью типичных металлопротеиназ матрикса, при этом она способна гидролизовать только коллаген. Ниже (Табл. 7) показаны активности двух исследованных ферментных препаратов и их изменение под действием различных гидролизатов и водных экстрактов.

Таблица 7

Остаточная активность протеолитических ферментов в присутствии препаратов из хрящевой ткани (на примере кальмара) при использовании различных субстратов.  
Массовое соотношение фермент : ингибитор 1 : 1

Ингибитор	Крусэнзим <i>Paralithodes camtchatica</i>	Коллагеназа <i>Clostridium histolyticum</i>
Казеин		
Отсутствует	260 Е/г	0
Водный экстракт	88,6	-
Гидролизат	72,8	-
Коллаген		
Отсутствует	69 Е/мг	220 Е/мг
Водный экстракт	22,8	68,2
Гидролизат	3,5	39,6

Примечание. Прочерк – не определяли.

В водном экстракте хряща кальмара преобладали белковые компоненты ниже 10 кДа (90% от суммы), после ферментативного гидролиза соотношение фракций менялось в сторону преобладания более весомых компонентов – выше 200 кДа (около 40%) и от 30 до 160 кДа (около 50%), доля низкомолекулярных соединений снижалась до 10%. При этом ингибиторная активность гидролизатов была существенно выше, чем водного экстракта. Продукты водного экстракта хрящевой ткани снижали скорость расщепления коллагена из кожи телят ферментами гепатопанкреатина (преимущественно сериновыми протеиназами) и металлозависимой коллагеназой из

*Clostridium histoliticum* на 66 % и 70 %, соответственно, в то время как продукты ферментативного гидролиза хряща (ФГ) в отношении тех же ферментов уменьшают ее на 95 % и 82 %, соответственно. Как показано ранее, сериновые протеиназы, входящие в состав гепатопанкреатина, способны гидролизовать широкий спектр белковых субстратов как глобулярной, так и фибриллярной структуры (Пивненко и др., 2010, Сахаров, Литвин, 1992). Компоненты гидролизованного хряща кальмара и его водного экстракта в различной степени тормозили переваривание таких субстратов, как коллаген и казеин, одними и теми же ферментами. При массовом соотношении ферментный препарат: гидролизат – 1 : 1 наблюдаемая остаточная активность при расщеплении казеина составила 28 %, а коллагена – 6 %.

Ингибиторная способность гидролизата из деградированного хряща акулы (ранее полученного тем же способом) по отношению к микробиальной коллагеназе оказалась ниже, чем для препарата из кальмара, а активность по коллагену снизилась на 33 % (Клычкова, Пивненко, 2001).

Таким образом, установлено, что хрящевая ткань морских организмов и продукты ее гидролиза проявляют антиколлагенолитическую (по отношению к фибриллярному, нерастворимому белку) и антиказеинолитическую активности (по отношению к растворимому денатурированному белку). Пока не установлена принадлежность ингибиторной активности к конкретному компоненту исследованных препаратов и не ясно также, за счет чего происходит увеличение ингибиторной активности гидролизованного хряща. Однако наличие антипротеазной активности позволяет предполагать наличие противовоспалительной активности.

#### *Состав ферментативных гидролизатов из хрящевой ткани (ГХ) гидробионтов*

Для сравнения с известными коммерческими препаратами-хондропротекторами ферментативные гидролизаты (ФГ) из хрящевой ткани гидробионтов охарактеризованы по содержанию гексозаминов, хондроитинсульфатов, гиалуроновой кислоты, гексоз, свободных дисахаридов, коллагена и неколлагеновых белков и минеральных веществ (Суховерхова, 2006). По содержанию гексозаминов ФГ из тканей хрящевых рыб (катрана, полярной акулы и калуги) в 3 раза

превосходят таковые из костно-хрящевой ткани лосося и хрящеподобной ткани кальмара. ФГ из хрящевой ткани ската отличается наибольшим содержанием гексозаминов (Табл. 8).

Таблица 8

Сравнительный состав гексозаминов и сульфат-ионов в ГХ, % от сухого вещества

Препарат	Гексозамины	Сульфат-ионы	Соотношение гексозамины: сульфат-ионы
<i>Ферментативные гидролизаты из хрящевой ткани</i>			
полярной акулы	4,0 ± 0,10	6,5 ± 0,1	1 : 1,62
катрана	5,0 ± 0,10	6,8 ± 0,2	1 : 1,36
ската	6,3 ± 0,20	6,5 ± 0,2	1 : 1,00
калуги	4,8 ± 0,09	5,9 ± 0,1	1 : 1,24
кальмара	1,9 ± 0,02	6,3 ± 0,1	1 : 3,20
горбуши	2,1 ± 0,01	6,4 ± 0,1	1 : 3,0
<i>Коммерческие препараты</i>			
Хонсурид (Россия)	20,8 ± 0,6	7,5 ± 0,15	1 : 0,36
Гиалуроновая кислота (США)	15,2 ± 0,3	5,7 ± 0,18	1 : 0,38
Структум (Франция)	14,2 ± 0,3	11,5 ± 0,10	1 : 0,80
Глюкозаминосульфат (США)	38,4 ± 0,8	10,4 ± 0,40	1 : 0,30

Примечание. n = 9.

Количество хондроитинсульфатов в ГХ оценивали по содержанию сульфат-ионов, как предложено в фармакопейной статье № 42-1286-99 «Хонсурид». Соотношение гексозаминов и сульфат-ионов в ФГ из хрящевой ткани акулы, ската, катрана и осетра составляет примерно 1 : 1, а в гидролизатах из кальмара и лосося – 1 : 3. В качестве образца для сравнения использовали фармпрепарат «Хонсурид», который представляет собой хондроитинсульфат с чистотой 99 %. При этом содержание в нем гексозаминов, согласно фармстатье, должно быть не менее 20 %, а сульфат-ионов – не менее 15 %, т.е. искомое соотношение должно составлять 1 : 0,8. Однако при экспериментальной проверке оказалось, что содержание сульфат-ионов в коммерческих препаратах ниже, что позволяет говорить о меньшей степени сульфатирования присутствующих в них гликозаминогликанов в отличие от ферментативных гидролизатов из хрящевой

ткани гидробионтов. Известно, что активность гликозаминогликанов обусловлена их полианионной структурой и зависит от наличия в каждой дисахаридной единице хотя бы одной отрицательно заряженной карбоксильной или сульфатной группы, обеспечивающей высокую гидрофильность и поверхностно-активные свойства (Данилевская, Николаев, 2002). Таким образом, высокая степень сульфатирования углеводов в ферментативных гидролизатах хрящевой ткани гидробионтов позволяет предположить их высокую биологическую активность.

Кроме сравнительного анализа гексозаминов и сульфат-ионов определен состав ряда других углеводных компонентов в полученных гидролизатах (Табл. 9). По результатам качественного и количественного анализа гидролизатов показано, что они преимущественно

Таблица 9

Состав углеводных компонентов ферментативных гидролизатов из хрящевой ткани гидробионтов, %

Ферментативный гидролизат	Сумма гексозаминов	Гиалуроновая кислота	Гексозы	Свободные гексозамины
<i>Из хрящевой ткани</i>				
акулы	4,4	2,0	1,6	0,5
калуги	4,8	1,9	0,5	0,4
горбуши	2,2	1,1	0,2	0,6
кальмара	2,0	1,0	0,3	0,7

различаются содержанием гиалуроновой кислоты и гексозаминов. В ФГ из хрящевой ткани акулы и осетра в два раза больше гексозаминов и гиалуроновой кислоты по сравнению с препаратами из лосося и кальмара, что, по-видимому, может быть объяснено видовыми особенностями ткани.

Белковые компоненты ФГ характеризовали по содержанию коллагеновых и неколлагеновых белков (Табл. 10).

В исследуемых ФГ содержание коллагена варьировало от 16,2 до 24,8% в зависимости от вида сырья и было практически в 2–3 раза ниже, чем в хрящевой ткани крупного рогатого скота (40–60%) (Слуцкий, 1969) и мускульной оболочке кукумарии (40–57%) (Слуцкая, 1972). Содержание неколлагеновых белков в ФГ рассчитывали

Таблица 10

Содержание коллагена в ферментативных гидролизатах из хрящевой ткани гидробионтов, %

Показатели	Акула	Осетр	Лосось	Кальмар
Азот коллагена	8,3	13,4	7,0	7,9
Оксипролин	1,84	3,0	1,82	1,41
К (коэффициент пересчета оксипролина на коллаген)	13,5	7,5	8,9	12,0
Коллаген	24,8	22,5	16,2	16,9
Неколлагеновые белки	22,3	23,8	42,7	45,0

по формуле, предложенной с учетом количества в препарате тирозина – специфичной для неколлагеновых белков аминокислоты (Слуцкий, 1985). Известно, что в коллагене содержится не более 0,4–0,6% тирозина, в неколлагеновых белках содержание тирозина примерно в 10 раз выше. Определив общую концентрацию тирозина и оксипролина в препаратах, можно оценить содержание неколлагеновых белков (Суховерхова, 2006). В отличие от хрящевой ткани человека и костей крыс, содержащих 11–16% и 10,9–12% неколлагеновых белков, соответственно (Слуцкий, 1985), хрящевая ткань гидробионтов характеризуется иным соотношением указанных компонентов.

В целом же ферментативные гидролизаты гидробионтов по содержанию гексозаминов и хондроитинсульфатов сравнимы с известными коммерческими препаратами и, кроме того, дополнены коллагеном и неколлагеновыми белками как естественной составной частью хрящевой ткани.

#### *Фракционный состав ферментативных гидролизатов из хрящевой ткани гидробионтов*

В большинстве случаев исследования в области анализа гликозаминогликанов проводятся в следующих направлениях: 1) идентификация различных типов гликозаминогликанов, 2) определение молекулярной массы и 3) структурный анализ доменов гликозаминогликанов. Идентификацию типов гликозаминогликанов проводят в основном методом ионно-обменной высокоэффективной жид-

костной хроматографии на различных сорбентах. Предварительно образцы подвергают последовательному ферментативному гидролизу либо получают производные гликозаминогликанов (Imanari et al., 1996). Структурный анализ доменов гликозаминогликанов заключается в предварительном получении моно-, ди-, три-, тетра-сахаридов с помощью специфичных ферментов. С использованием антител на данные сахара идентифицируют структуры последних и выделяют с помощью аффинной хроматографии. Полученные очищенные сахара подвергают структурному анализу методом ЯМР или капиллярным электрофорезом.

В качестве стандартов для определения молекулярных масс гликозаминогликанов используют нативные монодисперсные гликозаминогликаны либо синтезированные полимеры, такие как сульфатированные декстраны. Вастесен (цит. по: Imanari et al., 1996) впервые показал, что монодисперсные гликозаминогликаны пригодны в качестве стандартов для определения молекулярных масс неизвестных гликозаминогликанов. Получен также монодисперсный гликозаминогликан из коммерческого хондроитинсульфата А трахеи быка, рекомендуемый в качестве стандарта для жидкостной хроматографии. Для определения молекулярных масс низкомолекулярных гликозаминогликанов также используют стандарты мономеров гликозаминогликанов.

Для исследования фракционного состава ферментативных гидролизатов использовали хроматографическую систему, позволяющую одновременно анализировать белковые и углеводные компоненты хрящевой ткани. Показано, что в процессе ферментативного гидролиза, образуется несколько фракций. Все фракции содержали компоненты протеогликановой природы, так как поглощение наблюдается и при рефрактометрическом детектировании и при длине волны 280 нм (рис. 2, А).

Разделение и количественное определение углеводных компонентов, содержащих хондроитинсульфаты и гиалуроновую кислоту, в пробах сравнивали с имеющимися стандартами, в качестве которых использовали коммерческие препараты различных типов хондроитинсульфатов (ХС): ХС А, ХС С, ХС D, ХС А-1 и гиалуроновую кислоту. Сопоставление хроматограмм позволило предположить, что высокомолекулярные фракции, образованные в процессе фер-

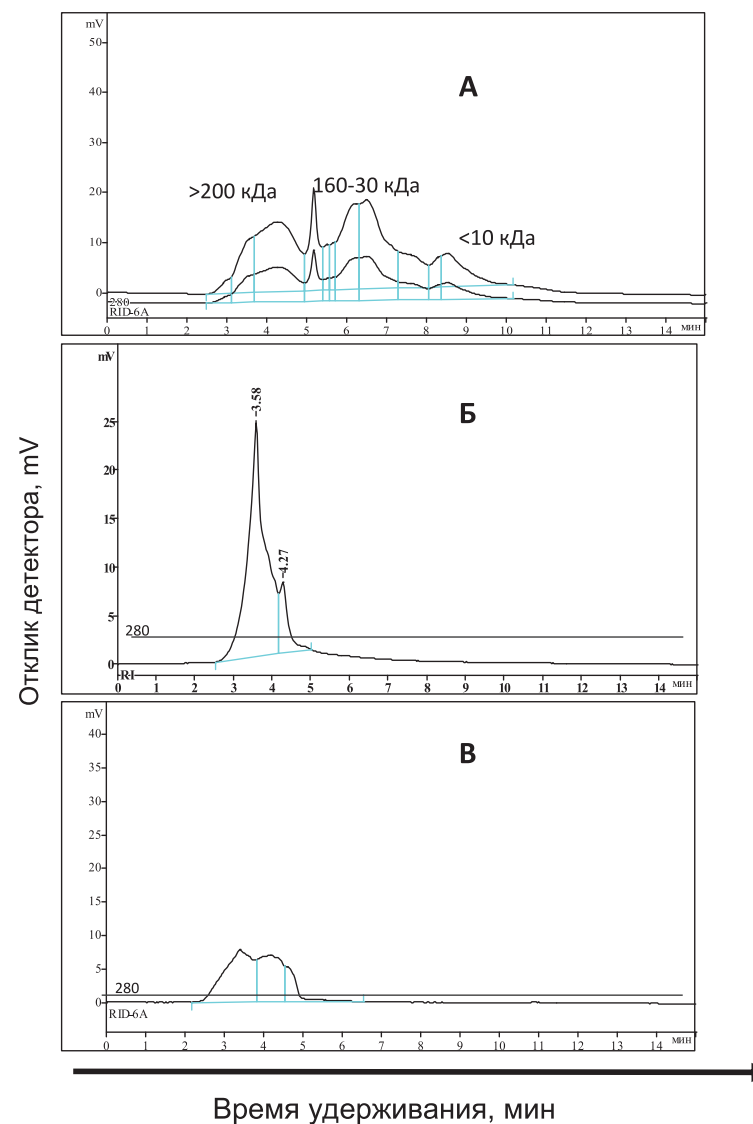


Рис. 2. Хроматограммы ферментативного гидролизата из хрящевой ткани осетра (А) и стандартов хондроитинсульфата А (Б) и гиалуроновой кислоты (В). Разделение проводили методом ВЭЖХ на колонке Shodex Asahipak GS-520 Н. Детектирование осуществляли одновременно рефрактометрическим детектором RID 6А и при УФ 280 нм



ментативного гидролиза, действительно содержат хондроитинсульфаты и гиалуроновую кислоту (рис. 3).

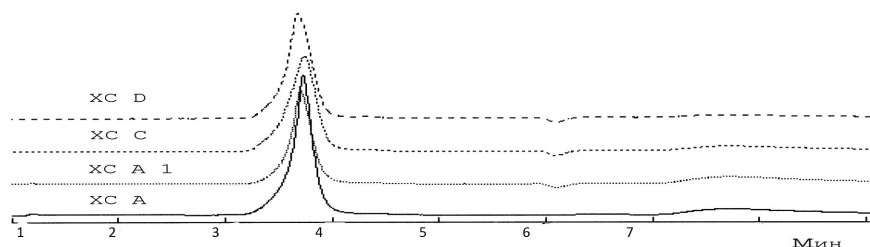


Рис. 3. Хроматограмма стандартов хондроитинсульфатов А из трахей быка (XC A), А из хряща осетра (XC A 1), С (XC C) и D (XC D). Разделение проведено методом ВЭЖХ на колонке Shodex Asahipak GS-520H, детектирование RID-6A

Исследование хроматографического поведения четырех типов хондроитинсульфатов (А, А1, С, Д) на колонке Shodex Asahipak GS-520H показало, что добиться удовлетворительного разделения хондроитинсульфатов не удается вследствие полидисперсности имеющихся стандартов и сходства по времени удерживания при их разделении на колонке, что не может являться показателем для идентификации типов хондроитинсульфатов в неизвестных образцах.

Для регистрации разделяемых компонентов использовали рефрактометрический детектор, сигнал которого пропорционален концентрации вещества и практически не зависит от его природы и молекулярной массы, поэтому можно идентифицировать пики на хроматограмме, содержащей углеводные полимеры, в составе которых имеются хондроитинсульфаты и гиалуроновая кислота. Было трудно идентифицировать свободные аминокислоты в ферментативных гидролизатах методом ВЭЖХ, так как они выходят вместе с низкомолекулярными соединениями белковой природы.

Хроматографическое разделение ферментативных гидролизатов (рис. 4) из хрящевой ткани гидробионтов показало, что их состав представлен 7–8 фракциями, которые условно можно разделить на три основных группы: фракции, содержащие высокомолекулярные компоненты (ВМС – 200 кДа и более), среднемолекулярные (СМС – 30–160 кДа) и низкомолекулярные компоненты (НМС – 1–10 кДа и менее). Все фракции содержат компоненты протеогликановой при-

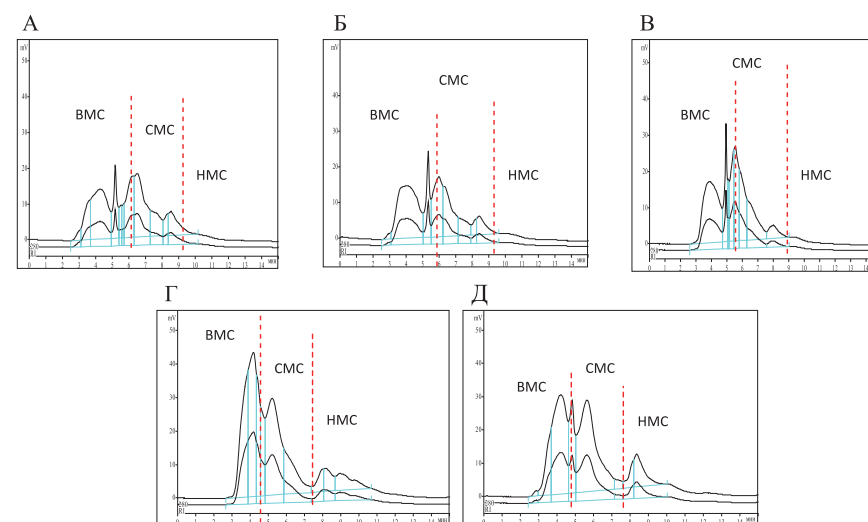


Рис. 4. Хроматограммы ферментативных гидролизатов из хрящевой ткани гидробионтов, полученных с помощью гепатопанкреатина (А – акулы, Б – ската, В – осетра, Г – лосося, Д – кальмара)

роды, так как поглощение пиков наблюдается при рефрактометрическом детектировании и при 280 нм.

При соблюдении разработанных условий гидролиза хрящевой ткани в препаратах содержание высокомолекулярной фракции, представленной гиалуроновой кислотой и хондроитинсульфатами, аналогично для препаратов из акулы, ската и калуги (34 %, 36 %, 33 %, соответственно) и значительно выше в препаратах из лосося и кальмара (51 % и 40 %).

Сравнение качественного состава полученных ФГ с препаратами-аналогами показало, что большинство из последних являются монокомпонентными, в их состав входят либо высокомолекулярные соединения (ВМС) – фармпрепараты «Структум» и «Хонсурид», либо низкомолекулярные (НМС) – БАД «Глюкозаминсульфат» (рис. 5). БАД к пище «Инолтра» представляет искусственно созданную композицию. ФГ из хрящевой ткани гидробионтов является поликомпонентным сбалансированным продуктом.

Таким образом, исследование молекулярно-массового распределения показало, что ферментативные гидролизаты из хрящевой

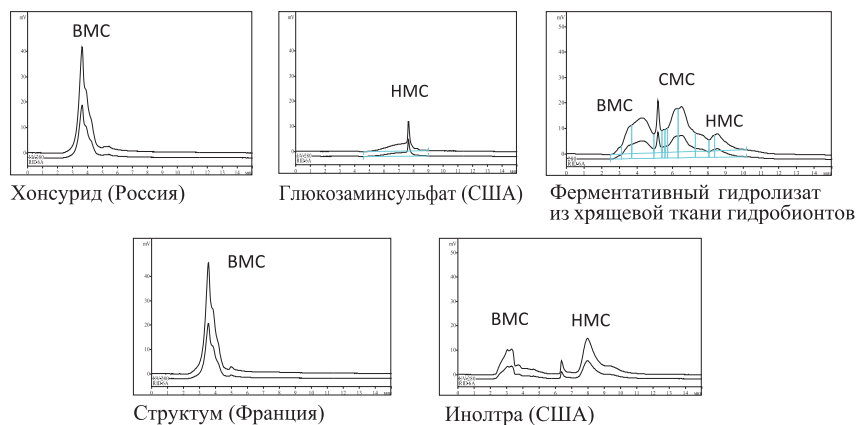


Рис. 5. Хроматограммы препаратов-аналогов из хрящевой ткани. Разделение проводили методом ВЭЖХ на колонке Shodex Asahipak GS-520 Н. Детектирование осуществляли одновременно рефрактометрическим детектором RID 6А и при  $\lambda = 280$  нм

ткани гидробионтов представляют комплекс продуктов гидролиза протеогликанового комплекса хрящевой ткани с различной молекулярной массой.

### Исследование состава свободных дисахаридов

Для характеристики различий в составе углеводных компонентов ферментативных гидролизатов был использован сравнительный анализ содержания свободных дисахаридов с различной степенью сульфатирования, получаемых в процессе ферментативного гидролиза протеогликанов хрящевой ткани гидробионтов.

Количественное определение гексозаминов без предварительного исчерпывающего гидролиза экстрактов и ферментализатов позволило установить, что в процессе ферментативного гидролиза хрящевой ткани происходит накопление свободных гексозаминов. Анализ свободных дисахаридов и моносахаридов методом ВЭЖХ затруднен тем, что в процессе разделения по молекулярной массе они выходят в области низкомолекулярных соединений вместе с низкомолекулярными белками.

В связи с этим возникла необходимость поиска более чувствительных методов идентификации качественного состава свобод-

ных дисахаридов. Анализ биологических образцов, содержащих гликозаминогликаны, возможен с помощью метода капиллярного электрофореза. Главным преимуществом данного метода является возможность анализа водных растворов образцов, а точнее ди- и трисульфатированных дисахаридов хондроитинсульфата в гидролизатах хряща, которые при пероральном применении обладают высокой биодоступностью (Данилевская, Николаев, 2002). Используя метод капиллярного электрофореза и зная характерные условия разделения определенной группы соединений, возможно легко разделить и идентифицировать различные типы ди- и трисульфатированных дисахаридов, входящих в состав биополимеров.

Для проведения данного анализа использовали метод определения несulfатированных дисахаридов гиалуроновой кислоты и различно сульфатированных дисахаридов хондроитинсульфатов с помощью капиллярного электрофореза после ферментативного гидролиза хондроитинсульфатов хондроитиназами (Karamanos et al., 1995). Автором установлены закономерности выхода различно сульфатированных дисахаридов. Так, первоначально в данных условиях мигрируют трисульфатированные, затем дисульфатированные, моно- и несulfатированные дисахариды. Под действием хондроитиназ происходит специфичное расщепление полимера на дисахаридные остатки. Структуры дисахаридов, полученных после ферментативного гидролиза специфичными хондроитиназами, представлены на рис. 6. Исследован качественный состав и определено количественное содержание дисахаридов, образованных после гидролиза протеолитическими ферментами, имеющих аналогичные структуры и способных разделяться при условиях данного метода.

Разделение дисахаридов ферментативных гидролизатов из хрящевой ткани гидробионтов проводили на приборе «Капель-105» (Люмэкс, Россия). Анализ проведен на кварцевом капилляре (75  $\mu\text{м}$  внутренний диаметр, общая длина капилляра 60 см, эффективная длина капилляра 55 см) при длине волны 210 нм и температуре 25°C. Результаты обработаны с помощью программно-аппаратного комплекса для сбора и обработки хроматографических данных МультиХром (версия 1.5х). Количественное содержание определяемых в препаратах свободных дисахаридов выражали в процентах от всей

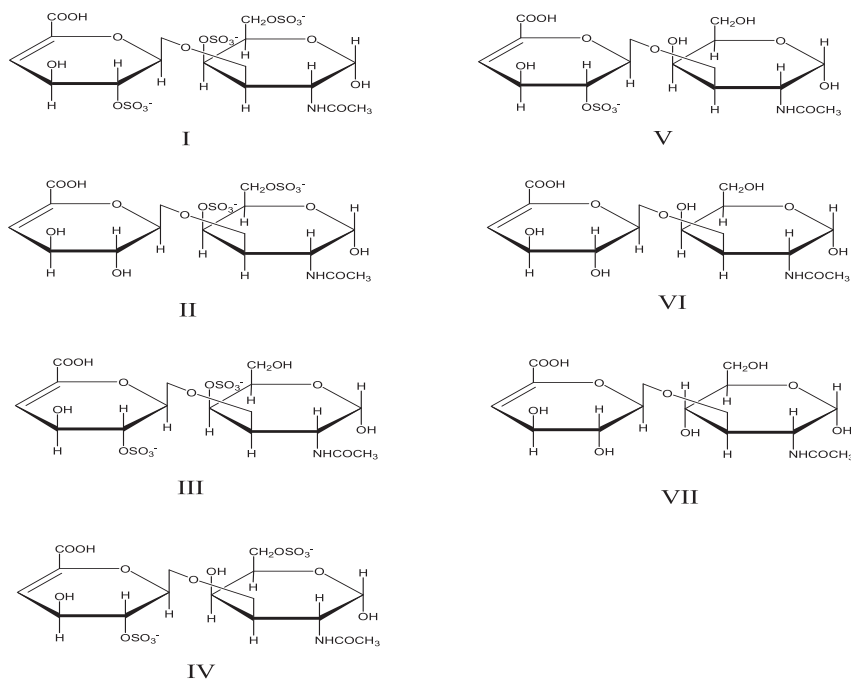


Рис. 6. Структуры сульфатированных и несulfатированных Δ-дисахаридов хондроитинсульфата (Karamanos et al., 1995).

I – Δ-ди (2,4,6) трисульфатированный; II – Δ-ди (4,6) дисульфатированный; III – Δ-ди (2,4) дисульфатированный; IV – Δ-ди (2,6) дисульфатированный; V – Δ-ди (2) моносульфатированный; VI – Δ-динесульфатированный) и гиалуроновой кислоты; VII – Δ-динесульфатированный

суммы содержащихся сульфатированных и несulfатированных дисахаридов.

Определен состав свободных дисахаридов в ГХ, полученных после гидролиза протеолитическими ферментами (Табл. 11). Состав дисахаридов при соблюдении одних и тех же приемов технологии переработки сырья определяется видоспецифичностью ткани. Во всех гидролизатах вне зависимости от вида хрящевой ткани отмечено высокое содержание несulfатированных дисахаридных остатков хондроитина и гиалуроната (структуры VI и VII).

ФГ из ткани хрящевых рыб (акулы, ската и осетра) аналогичны по составу и по соотношению дисахаридов. Характерной особенностью

Таблица 11

Содержание свободных дисахаридов в ферментативных гидролизатах хрящевой ткани гидробионтов (номера структур соответствуют рис. 5)

Содержание Δ-дисахаридов, %	Акула	Скат	Осетр	Лосось	Кальмар
I	0	0	0	0	0
II	6	5	9	0	3
III	3	1	2	0	2
IV	13	1	1	17	0
V	10	7	10	15	0
VI	14	20	14	11	7
VII	54	66	64	50	78

стью названных видов рыб является преимущественное содержание несulfатированных (примерно 70–93%) и меньшего количества моно- и дисульфатированных дисахаридов (30–27%). В ФГ из хрящевых рыб и осетров (хрящевых ганоидов) содержится минимальное количество дисульфатированных дисахаридов с сульфатными группами в положениях 2,4 и 2,6 (III, IV). Преобладающими являются моносульфатированные дисахариды (V) и дисульфатированные дисахариды с сульфо-группой в положениях 4,6 (II).

ФГ из костно-хрящевой ткани лососевых рыб отличается наличием трисульфатированных дисахаридов (структура I). Присутствуют также дисульфатированные в положениях 2,6 дисахариды (структура IV). Соотношение дисульфатированных дисахаридов к моносульфатированным (структура V) в ФГ из хрящевой ткани лососевых равно 1 : 1. Количество несulfатированных дисахаридов (структуры VI и VII) для этого объекта по сравнению с другими минимально – 61%. Количество сульфатированных дисахаридов в сумме составляет 39%.

Хрящевая ткань кальмара по содержанию несulfатированных дисахаридов (95%) превосходила все исследованные хрящевые ткани гидробионтов (структуры VII и VI), из которых 78% – несulfатированный гиалуронат (VII). Характерной особенностью хряща кальмара было отсутствие моно- и трисульфатированных дисахаридов. Из дисульфатированных дисахаридов идентифицированы

структуры II и III, количество которых составило 3% и 2%, соответственно.

Свободные дисахариды, образованные в процессе ферментативного гидролиза, могут служить маркерами видовой принадлежности хрящевой ткани гидробионтов. В целом наличие свободных дисахаридов является еще одной отличительной особенностью полученных ФГ, определяющей их биологическую активность благодаря высокой степени усвояемости при пероральном применении (Пивненко и др., 2010).

#### *Аминокислотный состав ферментативных гидролизатов из хрящевой ткани гидробионтов*

По составу аминокислот гидролизаты не отличаются друг от друга. Видовые различия ФГ из хрящевой ткани рыб определяются суммарным содержанием и количеством отдельных аминокислот (Табл. 12). Подобное количественное содержание отдельных аминокислот характерно для коллагена, в котором преобладают глицин, пролин и оксипролин. Поэтому данный препарат может рассматриваться как строительный материал для синтеза новых молекул коллагена.

После детального рассмотрения компонентного состава ферментативных гидролизатов из хрящевой ткани гидробионтов был сделан вывод о том, что ГХ из различных сырьевых источников могут быть стандартизованы по содержанию гексозаминов (не менее 2%). Это позволяет создавать близкие по дозировке активных компонентов готовые формы (таблетки, капсулы) из различных источников сырья (Табл. 13). Биопрепараты имеют сбалансированный состав в доступной для организма форме, а также проявляют антипротеазную активность как один из существенных факторов противовоспалительного действия.

#### *Противовоспалительная активность гидролизатов из хрящевой ткани гидробионтов*

Исследована в НИИ эпидемиологии и микробиологии СО РАМН и оценена на модели инфекционно-аллергического псевдотуберкулезного артрита у кроликов.

При этом заболевании наблюдаются не только бактериально-токсическое поражение многих органов и систем (в том числе раз-

Таблица 12

Содержание аминокислот в ферментативных гидролизатах из хрящевой ткани гидробионтов, % от суммы аминокислот

Аминокислота	Акула	Калуга	Лосось	Кальмар
Аспарагиновая	8,5	7,5	10,1	10,7
Глутаминовая	12,7	13,0	14,3	15,3
Пролин	16,4	18,9	11,0	8,6
Серин	4,0	3,7	4,9	5,2
Аланин	6,25	6,8	7,2	5,7
Цистеин	2,5	0,9	1,4	1,5
Тирозин	1,84	1,9	2,9	3,1
Глицин	12,1	18,6	11,0	9,5
Изолейцин	4,4	2,5	2,2	3,8
Лейцин	5,5	4,7	6,1	6,7
Лизин	4,2	3,1	6,5	6,7
Метионин	0,5	0,6	0,7	0,6
Фенилаланин	3,9	2,8	3,2	3,8
Треонин	4,8	3,1	4,3	4,8
Валин	5,1	3,1	3,3	4,2
Гистидин	2,6	1,6	2,4	2,1
Аргинин	6,3	6,8	6,1	7,6
NH <sub>3</sub>	1,7	0,7	0,6	0,7
Сумма, % массы препарата	31,2	32,2	55,3	52,4

витие полиартрита), но и возникновение иммунопатологических состояний и реакций. Использованная модель (Исачкова и др., 1984) позволяет оценить влияние препарата из хрящевой ткани гидробионтов, как на состояние пораженных органов, так и на состояние иммунитета (Табл. 14).

Полученные результаты позволили сделать заключение о том, что ГХ оказывает положительный эффект и уменьшает морфологические проявления инфекционно-аллергического псевдотуберкулезного артрита. Препарат также обладает общеукрепляющим действием, вызывая улучшение общего состояния животных и развитие тканевых иммуноморфологических реакций (Пивненко и др., 2005).

Таблица 13

Состав ферментативных гидролизатов из хрящевой ткани гидробионтов, % от сухого вещества

Компоненты ферментативных гидролизат	Гидробионты			
	акула	калуга	лосось	кальмар
<i>Углеводные:</i>				
гексозамины	4,4 ± 0,1	4,8 ± 0,09	2,11 ± 0,01	2,00 ± 0,02
гиалуроновая кислота	2,0 ± 0,05	1,9 ± 0,03	1,1 ± 0,03	1,0 ± 0,04
свободные дисахариды	0,5 ± 0,01	0,4 ± 0,008	0,6 ± 0,01	0,7 ± 0,009
гексозы	1,6 ± 0,05	0,5 ± 0,01	0,2 ± 0,01	0,3 ± 0,02
хондроитинсульфаты	6,5 ± 0,14	6,0 ± 0,1	6,4 ± 0,1	6,3 ± 0,1
<i>Белковые:</i>				
коллаген	25 ± 0,8	23 ± 0,7	16 ± 0,2	16,8 ± 0,2
неколлагеновые белки	22 ± 0,9	23,8 ± 0,9	42,7 ± 1,0	45 ± 1,1
Свободные аминокислоты	17,25 ± 0,4	15,4 ± 0,3	13,2 ± 0,5	12,5 ± 0,5
Минеральные вещества	9,0 ± 0,04	10,0 ± 0,06	10,0 ± 0,05	8,0 ± 0,06

*Влияние ферментативных гидролизатов из хрящевой ткани гидробионтов на экспрессию активационных мембранных лимфоцитов периферической крови*

В НИИЭМ им. Г.П. Сомова под руководством д.м.н. Т.С. Запорожец проведены исследования по влиянию БАД из хрящевой ткани гидробионтов на экспрессию активационных мембранных молекул лимфоцитов периферической крови. Воспаление относится к числу наиболее распространенных патологических процессов и, являясь реакцией организма на местное повреждение, представляет собой сложное переплетение различных нервных, гуморальных и эффекторных механизмов, лежащих в основе большого числа воспалительных феноменов (альтерации, расстройств микроциркуляции с экссудацией и эмиграцией, пролиферации). Начальные

Таблица 14

Результаты испытаний БАД к пище из хрящевой ткани гидробионтов на модели инфекционно-аллергического псевдотуберкулезного артрита

Показатели	Контрольная группа	Опытная группа
Общие симптомы	Непостоянная хромота, обильное выпадение шерсти	Активность, прибавление в весе. Гладкая шерсть без выпадения
Состояние пораженного коленного сустава	Округлость конфигурации коленного сустава, мелкоочечные кровоизлияния в суставной сумке. Серозная синовиальная жидкость в полости сустава	Единичные мелкоочечные кровоизлияния
Изменения в синовиальной оболочке коленного сустава	Отек синовии, набухание коллагеновых волокон. Умеренное расширение и полнокровие сосудов. Фибриноидное набухание стенок сосудов, диapedезные кровоизлияния. Периваскулярная и слабая диффузная инфильтрация синовиальной оболочки лимфоидно-макрофагальными клетками с примесью полиморфноядерных лейкоцитов, эозинофилов и плазматических клеток	Слабое разволокнение соединительной ткани, незначительная гиперемия сосудов, единичные кровоизлияния. Остаточные реактивно-воспалительные изменения
Макроскопические изменения внутренних органов	Синюшная окраска паренхимы легких, некротические очажки по краю и в паренхиме печени	Единичные очажки в стадии репарации
Микроскопические изменения внутренних органов (печень, селезенка, легкие, лимфатические узлы)	Слабо выраженные некротические изменения. Мелкие очажки бронхопневмонии. Дистрофические изменения гепатоцитов	То же, но на фоне гиперплазии бронхассоциированной лимфоидной ткани, умеренной лимфоидномacroфагальной инфильтрации в портальных трактах печени. Гиперплазия В- и Т-зависимых зон селезенки и лимфатических узлов.

стадии активационного процесса выражаются в запуске каскадных механизмов (чаще всего ферментных), конечной целью которых является экспрессия соответствующих генов. Продукты некоторых генов, связанных с активацией, появляются в различные сроки на поверхности лимфоцитов (Ярилин А. А., 1999). Таким образом, процесс активации сопровождается появлением, а чаще увеличением количества на внешней мембране лимфоцитов определенного набора эссенциальных, т.е. обязательных для данного функционального состояния клетки молекул. Это так называемые маркеры активации или «активационные» антигены.

Комплекс активных антигенных пептидов и молекул HLA 2 класса с рецептором CD4<sup>+</sup> Т-лимфоцита является сигналом, «запускающим» всю последующую иммунную реакцию с выработкой цитокинов, активированием новых макрофагов и лимфоцитов, мобилизацией нейтрофилов, продукцией специфических антител. Формирование комплекса рецептора лимфоцита (TCR-CD3) с антигенными пептидами и молекулой главного комплекса гистосовместимости (HLA-DR) служит одним из основных стимулов для дальнейших активационных процессов в иммунокомпетентных клетках. Часть из активационных молекул исходно отсутствует на поверхности лимфоцитов, и их экспрессия индуцируется в процессе обмена сигналами. Важными маркерами активации лимфоцитов является экспрессия рецепторов интерлейкина-2 (CD25), трансферрина (CD71), антигена CD95, опосредующего апоптоз. Последний появляется на поверхности клеток, свидетельствуя о предстоящем удалении лимфоцитов, выполнивших свою функцию. **CD69** – ранний маркер активации, вовлечен в ранние механизмы активации Т-клеток, ЕК-клеток, моноцитов и тромбоцитов, формирует димеры, которые могут функционировать как трансдуктор сигнала, усиливая клеточную активацию. Экспрессируется в повышенных количествах на Т-клетках из воспалительных инфильтратов при ревматоидном артрите, вирусных гепатитах, аутоиммунных заболеваниях щитовидной железы.

Модулируя выраженность на клеточной поверхности активационных антигенов, можно достичь направленного изменения состояния активации иммунокомпетентных клеток, опосредующих развитие воспаления.

Относительное содержание лимфоцитов периферической крови здоровых доноров, экспрессирующих ранние активационные маркеры (CD25, CD71, CD38, CD69) составляло  $10,7 \pm 1,2\%$ ,  $6,7 \pm 0,8\%$ ,  $36,0 \pm 2,4\%$ ,  $10,5 \pm 1,4\%$  соответственно.

Внесение в культуру лимфоцитов периферической крови гидролизата из хрящевой ткани в конечной концентрации 10 мкг/мл и 100 мкг/мл приводило к уменьшению экспрессии ранних активационных антигенов (Табл. 15).

Таблица 15

Изменение экспрессии ранних активационных антигенов на лимфоцитах периферической крови под действием БАД из хрящевой ткани гидробионтов

CD, %	Контроль	БАД	
		10 мкг/мл	100 мкг/мл
CD25 <sup>+</sup>	$10,7 \pm 1,2$	$6,8 \pm 0,6$ $p=0,02$	$12,3 \pm 1,6$ $p=0,7$
CD71 <sup>+</sup>	$6,7 \pm 0,8$	$2,2 \pm 0,3$ $p=0,00$	$5,8 \pm 0,9$ $p=0,4$
CD38 <sup>+</sup>	$36,0 \pm 2,4$	$25,2 \pm 1,8$ $p=0,005$	$25,9 \pm 2,3$ $p=0,01$
CD69 <sup>+</sup>	$10,5 \pm 1,4$	$6,8 \pm 0,8$ $p=0,05$	$22,6 \pm 2,1$ $p=0,000$
CD95 <sup>+</sup>	$28,3 \pm 2,0$	$13,7 \pm 2,1$ $p=0,00$	$20,9 \pm 3,0$ $p=0,028$

Снижение экспрессии активационных антигенов определяет изменение функциональной активности иммунокомпетентных клеток, а способность к их модуляции лежит в основе механизма противовоспалительного действия БАД из хрящевой ткани.

Таким образом, БАД к пище, полученная из хрящевой ткани гидробионтов, обладает умеренной противовоспалительной активностью, а также снижает уровень экспрессии ранних активационных антигенов лимфоцитов периферической крови человека.

#### *Эффективность БАД к пище из хрящевой ткани гидробионтов при полиостеоартрозе*

На базе Приморского краевого центра профилактики остеопороза под руководством И. А. Рубашек проведено клиническое испы-

---

---

тание БАД к пище из хрящевой ткани гидробионтов. Одновременно проводилось обычное медикаментозное лечение с использованием нестероидных противовоспалительных средств.

БАД получали 28 пациенток в возрасте от 50 до 55 лет, состоящие на учете в Приморском краевом центре профилактики остеопороза по поводу заболеваний опорно-двигательного аппарата – полиостеоартроза в сочетании с остеопеническим синдромом (доклинической стадии остеопороза). Все испытуемые дали согласие на участие в клиническом исследовании. БАД принимали по 2 капсулы 2 раза в день в течение 2 мес. Наблюдение за пациентками проводили в течение 6 мес. от начала приема БАД.

У всех испытуемых диагноз остеоартроза был подтвержден рентгенологически, при этом у 6 человек была I стадия, у 20 – II и у 2 – III рентгенологическая стадия процесса. Основным клиническим проявлением остеоартроза была боль в суставах.

Контрольную группу составили 15 женщин того же возраста с остеопеническим синдромом (Т-критерий был в среднем по группе –  $2,1 \pm 0,1$ ). Средняя продолжительность заболевания составила 2,1 года, суммарный индекс Лекена – 6,9, что достоверно не отличалось от показателей пациенток опытной группы. В контрольной и опытной группах пациентки в среднем 6,2 дня в месяц вынуждены были принимать НПВП в связи с болями в суставах.

В динамике наблюдения проводили осмотр пациенток врачом-ревматологом и оценивали выраженность болевого синдрома и функциональную способность суставов. Перед исследованием и через 6 мес. определяли плотность костной ткани на ультразвуковом костном денситометре.

Клинический эффект препарата выражался прежде всего в уменьшении выраженности болевого синдрома. Первые признаки положительного воздействия гидролизата появлялись через 2 нед. и достигали максимума через 1 мес. от начала приёма, оставаясь стабильными на протяжении всего времени наблюдения. Так, в группе больных, получавших гидролизат, исходный уровень боли по визуально-аналоговой шкале составил 5,4 (в контрольной группе – 5,8), а через месяц в группе испытуемых – 1,8 (в то время как в контрольной оставался на прежнем уровне – 6,0). 18 больных опытной группы, у которых была утренняя скованность в суставах, отметили

---

---

ее исчезновение через 1 мес. Интересным представляется тот факт, что 26 из 28 пациенток, получавших БАД, прекратили прием НПВП в связи с улучшением состояния, в то время как пациентки контрольной группы продолжали прием НПВП по потребности с прежней частотой. На фоне приема БАД значительно улучшалось функциональное состояние суставов – увеличивался объем активных и пассивных движений в сравнении с контрольной группой.

Оценка в динамике плотности костной ткани до начала приема БАД и через 6 мес. показала, что в опытной группе она стабилизировалась, не было отрицательной динамики плотности костной ткани, что является благоприятным прогностическим признаком течения остеопороза. Результаты отдаленного наблюдения за пациентками опытной группы показали, что у 26 из 28 пациенток (92,9%) наблюдалась стойкая ремиссия, в течение которой женщины практически не пользовались НПВП, и только у 2 пациенток через 5 мес. появились признаки некоторого ухудшения состояния. В контрольной группе на протяжении 6 мес. наблюдения пациентки продолжали принимать НПВП по потребности, которая увеличилась в осенне-зимний период до 8,3 дня, что достоверно выше исходных значений. Не было отмечено побочных нежелательных эффектов, связанных с использованием БАД.

Таким образом, БАД к пище из хрящевой ткани гидробионтов при употреблении в рекомендуемых дозах проявляет хорошую клиническую эффективность при остеоартрозе средней степени тяжести и может быть рекомендована пациентам при сочетании остеоартроза с начальными проявлениями остеопороза. БАД обладает как противовоспалительными, так и хондропротективными свойствами, быстро уменьшает болевой синдром, способствует улучшению функциональной способности суставов. На основании клинических испытаний получены рекомендации по проведению исследований для создания лекарственных средств.

## ГЛАВА 4

### ГИДРОЛИЗАТЫ ИЗ МЫШЕЧНОЙ ТКАНИ ГОЛОТУРИЙ

Морские организмы, относящиеся к классу голотурий, – трепанги и кукумарии считаются не только пищевыми деликатесами, но и источниками БАВ с многочисленными полезными эффектами (Bordbar et al., 2011). Трепанги пользуются высоким спросом на мировом рынке как продовольственные продукты и источник различных фармацевтических субстанций (Mehmet et al., 2011). Общее число известных в настоящее время видов морских огурцов составляет около 1250. Однако этот список постоянно пополняется.

Трепанги используются в питании и народной медицине преимущественно в странах Азии и Ближнего Востока. В литературе Китая и Малайзии трепанги описывают как эффективное средство против гипертонической болезни, астмы, ревматизма, порезов и ожогов, импотенции, запоров (Bordbar et al., 2011). Вещества, выделенные из трепангов, обладают антиангиогенной (Tian et al., 2005), антиопухолевой (Roginski et al., 2004), антикоагулянтной (Chen et al., 2003), гипотензивной (Hamaguchi et al., 2010), высокой противовоспалительной (Collin, 2004), антимикробной (Hing et al., 2007), антиоксидантной (Althunibat et al., 2009), антитромботической (Pacheco et al., 2000), антигистаминной, антиболевой (Ridzwan et al., 2003), антипаразитарной (Singh et al., 2008) активностями. Из вышеперечисленных свойств следует особенно обратить внимание на двойное действие БАВ из трепанга на опухолевый рост – антиангиогенное и цитотоксическое по отношению к опухолевым клеткам.

#### Тритерпеновые гликозиды

Голотурии особенно высоко ценятся как источник тритерпеновых гликозидов (ТГ) (Aminin et al., 2010а, б; 2011; 2015), хондроитинсульфата (Viera et al., 1991), сульфатированных полисахаридов

(Mourao, Pereira, 1999), стероинов (Mamelona et al., 2007), пептидов (Rafiundin et al., 2004), цереброзидов (Sugawara et al., 2006) и лектинов (Mojica, Merca, 2004).

Большой вклад в изучение физиологических эффектов ТГ голотурий внесли дальневосточные ученые (Aminin et al., 2011, 2015; Пислягин и др., 2014). В настоящее время из различных видов голотурий получены такие препараты, как кукумариозид, фрондозид, кумазид и др. В Тихоокеанском институте биоорганической химии ДВО РАН разработан и проходит всесторонние испытания защищенный патентом РФ препарат кумазид, представляющий собой суммарную фракцию ТГ, выделенную из голотурии *Siscumaria japonica*. Это соединение обладает значительным иммуномодулирующим действием. Исследование острой и хронической токсичности кумазида показало, что при внутривенном введении по параметрам острой токсичности он относится к малотоксичным веществам (IV класс опасности). При 3-месячном курсе введения крысам в дозах 1–100 мкг/кг кумазид не оказывает токсического действия (патент РФ. № 2271820).

По своей структуре ТГ представляют собой сложную систему, элементы которой структурно связаны между собой и влияют на ее функцию и адаптивную роль (рис. 7).

ТГ состоят из агликона и углеводной части. Последняя присоединяется к агликону посредством О-гликозидной или О-ацилозидной связей. Углеводные остатки тритерпеновых гликозидов из различных природных объектов отличаются друг от друга количественным

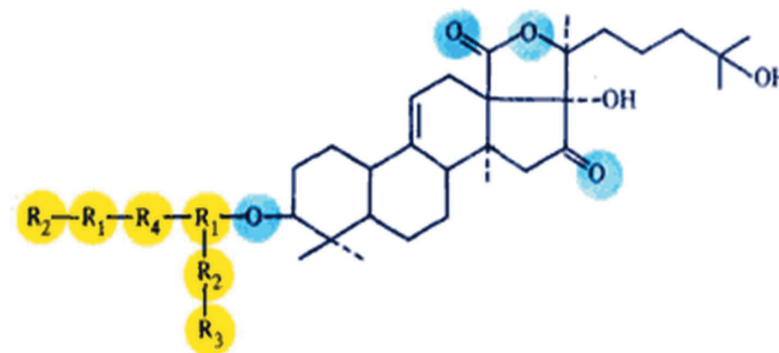


Рис. 7. Общая структура тритерпеновых гликозидов на примере голотурина В. R<sub>1</sub> = D-ксилоза, R<sub>2</sub> = D-глюкоза, R<sub>3</sub> = 3-О.метил, D-глюкоза, R<sub>4</sub> = D-хиновоза



содержанием и качественным составом входящих в них моносахаридов. ТГ отличаются друг от друга содержанием одной или нескольких углеводных цепей, которые могут быть линейными или разветвленными. По химическому строению агликона ТГ можно разделить на 2 группы: пентациклические и тетрациклические. Пентациклические ТГ распространены в растительном мире, тетрациклические – и в растительном (женьшень), и в животном мире (голотурии).

ТГ обладают мощным мембранолитическим действием, связанным с образованием комплексов с А5-стеринами мембран клеток-мишеней. Показана токсичность этих соединений, способных разрушать эритроциты крови; гемолиз обусловлен способностью связывать холестерин цитоплазматической мембраны эритроцитов. Эти свойства ТГ зависят от их молекулярной структуры, поэтому очень важно изучать их медико-биологическую активность и дозирование, при котором будут сочетаться безопасность и эффективность действия.

Кукумария японская содержит сложную смесь ТГ голостанового ряда (0,2–0,3% от сухой массы), имеющих одинаковые углеводные цепи, но различающихся строением агликонов. Они объединены в группы и получили обозначения А<sub>0</sub>, А<sub>1</sub>, А<sub>2</sub>, А<sub>3</sub>, А<sub>4</sub>, А<sub>6</sub>, А<sub>7</sub>. Гликозиды, входящие в группы А<sub>0</sub>, А<sub>1</sub>, А<sub>2</sub>, А<sub>4</sub>, относятся к моносulfатированным гликозидам, в группы А<sub>3</sub>, А<sub>6</sub> – к дисulfатированным гликозидам, группу А<sub>7</sub> – к трисульфатированным гликозидам (Дроздова и др., 1996; Stonik et al., 1999).

В препарате кукумариозид из *C. japonica* представлены все имеющиеся ТГ, однако не все из них стимулируют иммунную систему. Некоторые, в частности ди- и трисульфатированные компоненты гликозидной фракции, не активны или даже обладают иммуносупрессивными свойствами (Aminin et al., 2010). С этим связана неоднозначность действия препарата кукумариозид, который обладает относительно высокой токсичностью. Этим качеств лишен иммуномодулирующий препарат кумазид – комплекс моносulfатированных ТГ в сочетании со стеринном при молярном соотношении ТГ:стерин 1 : 2. Кумазид отличается меньшей цитотоксической (эмбриотоксической) и гемолитической активностями, чем кукумариозид. Так, кумазид имеет приблизительно в 20 раз меньшую гемолитическую активность, чем кукумариозид (Стоник и др., 2006).

С. А. Авилковым и соавт. (2008) исследованы иммуномодулирующие свойства фрондозид А–ТГ из голотурии северной Атлантики *C. frondosa*. Это соединение стимулирует лизосомальную активность макрофагов мышей на 30% по сравнению с контролем при введении в дозе 0,2 мкг/мышь в течение 10 дней, повышает показатели фагоцитоза в экспериментах *in vitro* по отношению к *Staphylococcus aureus* при максимальной концентрации 0,001 мкг/мл. Фрондозид действует преимущественно на клеточный иммунитет и значительно слабее – на гуморальный.

Об адаптогенном действии экстракта кукумарии японской при экспериментальном стрессе сообщают О. А. Солодкова с соавторами (2012). ТГ оказывают избирательное действие на сердечно-сосудистую систему, способны расслаблять мышцы стенок кровеносных сосудов и снижать кровяное давление, усиливать сокращение сердца и удлинять период отдыха сердечной мышцы. В результате исчезают застойные явления, восстанавливаются эластичность и проходимость сосудов.

#### *Противоопухолевая активность БАВ голотурий*

В литературе последних лет появляется все больше работ, в которых авторы в качестве антиопухолевых соединений предлагают биологически активные вещества голотурий. Так, фрондозид А, ТГ из голотурии *C. frondosa*, обуславливал дозозависимое уменьшение жизнеспособности опухолевых клеток линий LNM35, A549, NCI-H460-Luc2, MDA-MB-435, MCF7 и HepG2 более чем на сутки, при этом гибель клеток наступала по каспазо-3/7-зависимому пути апоптоза (Attoub et al., 2013). Данное соединение индуцировало зависимое от времени действия и концентрации подавление клеточной миграции, инвазии и ангиогенеза *in vitro*. В дозах 0,01 и 1 мг/кг массы в день при внутрибрюшинном введении в течение 25 дней фрондозид А значительно без выраженного токсического эффекта снижал рост, ангиогенез и метастазирование опухолей у бестимусных мышей. Фрондозид А усиливал ингибирующую активность противоопухолевого препарата цисплатина в отношении рака легких. Все эти данные характеризуют фрондозид А как перспективное противоопухолевое средство.

Другое соединение – фронданол А5 – экстракт ферментативно обработанного эпителия голотурии *C. frondosa* – содержал ТГ следующей структуры: моносulfатированный фрондозид А, дисulfатированный фрондозид В, трисульфатированный фрондозид С, а также 12-метилтетрадекановую кислоту и фукозилированный хондроитинсульфат. На модели рака толстой кишки, индуцированного у крыс введением азоксиметана, фронданол А5 показал защитный эффект (Janakiram et al., 2015). Через 3 дня после введения животным азоксиметана крысы получали диету, содержащую 150 и 450 промилле фронданола А5 в течение 8 нед. Применение этого препарата значительно и дозозависимо снижало образование тотальных колоний на 34–55 %, множественных аномальных крипт – на 48–69 %, т.е. он обладал потенциалом хемопротективных свойств, которые могут быть использованы при разработке новой стратегии терапии рака.

К многочисленным полезным эффектам БАВ из голотурий необходимо добавить противовирусное, антибактериальное и антифунгальное действие. Так, из ферментного гидролизата *C. frondosa* получена фракция с м.м. 100 кДа, которая была высокоактивна в отношении вируса *Herpes simplex-1* (HSV-1) при ЕС<sub>50</sub> – 18,2 мкг/мл.

#### *Мышечная и соединительная ткань голотурий,*

из которых состоит основная часть их тела, также содержит БАВ белковой и полисахаридной природы. Около 70 % мускульной оболочки трепангов представлено коллагеном (Zhao et al., 2007). Комплексы этих соединений образуют сложные структуры, слабо поддающиеся действию пищеварительных ферментов. Для того чтобы перевести их в растворимую, хорошо усваиваемую форму, используют метод ферментативного гидролиза. При этом наибольший выход и степень гидролиза могут быть достигнуты при использовании коллагенолитических ферментов, в частности коллагеназы из гепатопанкреаса крабов.

Трепанги содержат интересные комбинации ценных аминокислот: глицин (5,6–12,5 % от сырой массы), глутаминовую кислоту (4,7–7,3), аспарагиновую кислоту (3,5–5,1), аланин (2,9–5,8), аргинин (2,7–4,95) (Wen et al., 2010). Важным для медицины свойством аминокислотного состава трепангов является хорошо доказанное

гипохолестеринемическое действие, обусловленное низким показателем отношения лизин / аргинин. Отмечено триглицерил-липидемическое действие белковых фракций гидролизатов трепангов (Taboada et al., 2003). Глицин, содержащийся в трепангах, способен стимулировать продукцию ИЛ-2 и антител В-лимфоцитами и тем самым способствовать усилению фагоцитарных процессов. Глицин и глутаминовая кислота являются эссенциальными компонентами клеток, синтезирующих глутатион, который может стимулировать активацию и пролиферацию NK-клеток (Qin et al., 2008).

Установлено, что при ферментативном гидролизе мышечной ткани голотурий разрушению подвергаются не только коллаген, но и межучточное вещество, содержащее мукополисахариды, в состав которых входят связанные с белковыми молекулами гексозамин-содержащие вещества, высвобождающиеся в процессе ферментализации (Тимчишина, 1999). При этом в состав гидролизатов переходит также значительная часть ТГ. В табл. 16 представлен химический состав гидролизатов, полученных при оптимальных условиях ферментативного гидролиза.

Таблица 16

Характеристика гидролизатов из голотурии (Тимчишина, 1999)

Продукт	Тритерпеновые гликозиды, мкг/мл	Гексозамины, мг/мл	Окси-пролин, мг/100 мл	Белок, мг/100 мл
Гидролизат из цельной кукумарии	790	2,4	65,0	34,0
Гидролизат из мышечной ткани	230	2,2	85,0	46,0
Гидролизат из внутренностей	1240	3,7	52,0	22,0

Наибольшее количество белка и растворимого коллагена (соответствующего содержанию оксипролина) обнаружено в гидролизате из мышечной ткани кукумарии, а количество ТГ и гексозаминов (компонентов гиалуроновой кислоты и хондроитинсульфатов) было наибольшим в гидролизате из внутренностей.

---

---

По разработанной технологии получены препараты с высоким содержанием растворимых форм белков, гексозаминов, тритерпеновых гликозидов, что позволило отнести их к разряду лечебно-профилактических и послужило основанием для проведения медико-биологических испытаний.

#### *Применение продукции из кукумарии для лечения ожоговых больных*

Полученные продукты были испытаны в питании больных с термическими ожогами. На базе отделения термической травмы Дальневосточной центральной бассейновой больницы (ДВЦББ) проведено комплексное клиничко-лабораторное исследование состояния белкового обмена и защитных сил организма у 106 больных с ожоговым истощением. Для получения достоверных данных все пациенты были разделены на две группы по степени тяжести. Первую группу составили больные (61 чел.) с термическими ожогами III А-Б степени, площадью до 10–15 % поверхности тела, индекс тяжести поражения (ИТП) 30–45; вторую – 45 чел. с термическими ожогами III А-Б степени, площадью до 25–40 %, ИТП от 75 до 120. Всем больным назначали диету № 11. Каждая группа больных была разделена на две подгруппы. Первая группа – на контрольную и группу наблюдения, пациенты которой получали к диете № 11 дополнительно 50 г продукта из кукумарии в сутки в течение 14 дней. Вторая группа – на контрольную и группу наблюдения, пациенты которой получали дополнительно 70 г продукта из кукумарии в течение 21–28 дней. У всех пациентов первой группы на 11–12-е сутки с момента получения травмы было найдено существенное снижение общего белка сыворотки крови и альбуминов. В то же время отмечено значительное повышение уровня  $\alpha$ - и  $\gamma$ -глобулинов, что свидетельствовало о выраженных процессах деструкции в организме больных.

Изменения содержания аминного азота, мочевины и креатинина сыворотки крови свидетельствовали о глубоких нарушениях белкового обмена у больных контрольных групп и недостаточной эффективности обычной диеты и проводимой традиционной терапии. У пациентов контрольной группы значение фагоцитарного индекса (2,95) и индекса завершенности фагоцитарной реакции (1,78) к моменту

---

---

завершения лечения было существенно ниже уровня показателей донорской группы (5,37 и 4,54 соответственно), что свидетельствовало о значительном снижении функционирования фагоцитарной системы иммунитета.

Применение продукта из кукумарии сопровождалось выраженным клиническим улучшением (повышение настроения, улучшение аппетита, более быстрое очищение ран, лучшее приживление кожных аутотрансплантантов, ускорение эпителизации) и существенными изменениями в белковом обмене. Усиление анаболических процессов выражалось в росте содержания общего белка, альбумина, снижении содержания  $\alpha$ - и  $\gamma$ -глобулинов, ликвидации явлений диспротеинемии. Значение фагоцитарного индекса к моменту завершения лечения было значительно выше уровня контрольной группы (8,12 против 2,96), индекс завершенности фагоцитоза также был выше значений контрольной группы – 3,67 против 1,78 (хотя и оставался ниже уровня у доноров), что указывало на повышение защитных сил организма.

Таким образом, использование кукумарии в лечебном питании у этой категории больных оказывало быстрое положительное влияние на течение ожоговой болезни. Срок лечения больных сокращался на 1–3 койко-дня.

У больных второй группы – основной и контрольной – результаты применения продукта из кукумарии проявилось только на 3–4-е сутки, и только на 8–9-е сутки было зарегистрировано некоторое повышение содержания общего белка и альбумина. Эти показатели приближались к границам нормы на 30–40-е сутки. Применение продукта из кукумарии у больных с тяжелым течением болезни оказало постоянное и стабильное положительное влияние на течение ожоговой болезни у этой группы пациентов и позволило сократить сроки лечения больных в стационаре на 2–4 койко-дня.

Таким образом, использование продукта из кукумарии в качестве БАД к пище выявило ее положительное влияние не только на состояние белкового обмена, но и на фагоцитарные процессы в организме и свидетельствовало о благотворном действии предложенного варианта питания (Тимчишина, 1999).

---

---

*Применение гидролизата из кукумарии в качестве биологически активной добавки к рациону питания больных, перенесших радикальные обширные операции*

Больные, перенесшие обширные радикальные операции по поводу онкологических заболеваний желудочно-кишечного тракта, в последующем страдают от снижения отдельных функций этой системы, что проявляется в нарушении всасывания питательных веществ в кишечнике, нарушении синтеза белков и баланса электролитов, выраженном астеническом синдроме. Особенно сильно эти нарушения проявляются у пациентов, получавших химио- и лучевую терапию. Группа таких больных была сформирована в поликлинике ТОФ № 121 г. Владивостока. Под динамическим наблюдением онколога находилось 11 человек с послеоперационным периодом от 1 года до 4 лет: 4 человека – после гастрэктомии (полного удаления желудка); 3 человека – после резекции толстой и прямой кишки; 2 человека – после резекции и пластики пищевода и 2 больных – после мастэктомии.

Для купирования имеющихся нарушений больные получали гидролизат кукумарии 3 раза в день по 25 мл во время еды в течение 30 дней. Высокий положительный эффект был отмечен у больных с ярко выраженной астенией. У всех пациентов наблюдалось повышение аппетита, моторики, общего тонуса, отмечены клинические улучшения ферментативного переваривания пищи.

Большая роль в снижении частоты послеоперационных осложнений после хирургического лечения заболеваний желудка, ожогов и онкологических заболеваний отводится усилению иммунных процессов в организме. Для этого предлагаются различные лекарственные препараты – иммуномодуляторы, а также природные соединения и продукты функционального питания иммуномодулирующей направленности. У пациентов, получавших по специальной схеме кукумарию, наблюдалось увеличение общего числа лимфоцитов. Количество гнойных осложнений у этой группы пациентов было на 5,9 % меньше, чем в контрольной группе. Кроме того, энтеральное питание из кукумарии (зондовое и пищевые добавки) позволило снизить количество вводимых парентерально медикаментов, уменьшить число посттранфузионных реакций и осложнений.

---

---

Высокое содержание ценных биологически активных веществ, содержащихся в кукумарии, делает ее привлекательным объектом для получения различных продуктов лечебно-профилактического назначения. Л. И. Гуриной (1990) доказана эффективность предложенного автором метода энтерального питания с кукумарией в качестве средства, оказывающего иммуномодулирующее влияние на показатели клеточного и гуморального иммунитета у ослабленных пациентов в предоперационной подготовке и послеоперационном периоде после резекции желудка.

*Применение гидролизата из кукумарии в качестве биологически активной добавки при лечении вирусного гепатита А*

Группа больных из 20 человек 18–40 лет была сформирована на базе инфекционного отделения госпиталя ТОФ г. Владивостока. Из них у 9 человек наблюдался вирусный гепатит тяжелой степени с билирубинемией от 180 до 200, у 11 человек – вирусный гепатит средней степени тяжести с билирубинемией от 100 до 150.

Больные с гепатитом А получали гидролизат из кукумарии на протяжении 20 дней по 15 мл 3 раза в день до или во время еды. Побочных эффектов, аллергических реакций отмечено не было. При приеме препарата больными выполнялись контрольные исследования крови в начале, середине и в конце курса. В процессе лечения у пациентов, получавших гидролизат кукумарии, отмечено повышение уровня гемоглобина и числа эритроцитов в периферической крови. Остальные показатели не отличались от контрольных. В стадии реконвалесценции (примерно с 10 дня применения препарата) у всех больных группы наблюдения отмечено повышение аппетита, улучшение сна, повышение активности, работоспособности (Тимчишина, 1999).

*Изучение влияния гидролизата из кукумарии на сперматогенез у половозрелых беспородных мышей-самцов*

Самцам мышей в течение 6 нед. скармливали гидролизат в виде ежедневной добавки к основному корму. Мышам первой и второй опытной группы давали по 1,5 и 3 мл препарата на кг массы. Контрольную группу составили мыши, получавшие обычный корм без

---

добавок. Анализ состояния семенников производили на основании оценки соотношения клеточных генераций мужских половых клеток. На серийных парафиновых срезах семенных канальцев, окрашенных гематоксилином, подсчитывали соотношение сперматогониев разных генераций, определяли коэффициент митотической активности сперматогониев. Об активности сперматогенеза судили по соотношению разных стадий сперматид в семенных канальцах.

Цитологический анализ семенников позволил установить увеличение коэффициента митотической активности у опытных животных по отношению к контрольным с недостоверными различиями между опытными группами, получавшими разные дозы препарата. У животных, получавших гидролизат, отмечено увеличение количества семенных канальцев со сперматидами. Сдвиги функционального состояния семенников у подопытных животных не сопровождались изменениями массы семенников. Обзорное гистологическое исследование органа не выявило отклонений в морфологии яичек.

На основании проведенных исследований сделано заключение, что добавка гидролизата кукумарии в рацион половозрелых самцов мышей активизирует размножение сперматогониев, ускоряет сперматогенез и указывает на биологическую активность гидролизата из кукумарии (Тимчишина, 1999, Каредина и др., 2003).

Полисахаридные компоненты мышечной ткани голотурий также проявляют биологическую активность. Так, из голотурии *C. frondosa* был выделен обладающий иммуномодулирующей активностью полисахарид, который представлял собой фукозо-разветвленный хондроитинсульфат, ускоряющий созревание дендритных клеток человека и обладающий способностью активировать аллогенные CD4+ Т-клетки *in vitro* (Cale et al., 2013). Авторы путем ферментативного гидролиза и фракционирования на DEAE-сефарозе из мышечной ткани *C. frondosa* выделили высокомолекулярную фракцию, которая в дозах 100 и 1000 мкг/мл ускоряла созревание дендритных клеток, снижала уровень IL-10, IL-12p40 и IL-6 (последний только в дозе 1000 мкг/мл), продуцируемых этими клетками, и обладала способностью активировать аллогенные CD4+ Т-лимфоциты. Аллогенные CD4+ – клетки, культивированные вместе с дендритными клетками в присутствии фракции FcF-1 из кукумарии, секретировали меньше

---

IFN  $\gamma$  и больше IL-17, чем аллогенные CD4+ клетки, культивированные с дендритными без фракции FcF-1, т.е. действие фракции на Т-клетки, по-видимому, приводит к повышению Th17 и снижению Th1 активности, что может быть полезно для уменьшения интенсивности хронического воспаления.

Как известно, большой проблемой для онкологов и фармакологов является разработка нетоксичных лекарственных препаратов, которые увеличивали бы выживаемость пациентов с онкологическими заболеваниями. Еще в конце 90-х годов прошлого столетия президентом АМН СССР академиком Н. Н. Блохиным были организованы клинические испытания консервов «Кукумария натуральная – полуфабрикат» для онкологических больных в абдоминальном отделении Балашихинской больницы и ВОИЦ АМН СССР после резекции желудка по поводу рака. Исследования проводили в Клинике института питания АМН СССР, по результатам исследований было получено заключение о явно выраженном противоопухолевом действии консервов «Кукумария натуральная – полуфабрикат». Были разработаны и утверждены рецептура и техническая документация на ряд пищевых продуктов: масла, майонезы, пасты из кукумарии, рекомендованные при реабилитации онкологических больных (Ефимова, Савватеева, 1981).

#### *Пептиды гидролизованного коллагена голотурий*

Коллаген и его растворимые фракции уже много лет используются в комплексе лечения пациентов с артрозом и остеопорозом. Из этих представлений исходит применение диеты, богатой коллагеном, основанной на знаниях о его структурно-механической функции.

Но это касается только его нерастворимой фракции, тогда как несвязанные в цепи фрагменты имеют очень короткий биологический период полураспада. В настоящее время установлено, что пептиды коллагена играют важную роль в дифференциации клеток соединительной ткани, их пролиферации и клеточной активности. В Тихоокеанском институте биоорганической химии ДВО РАН разработан способ выделения из коллагена трепанга полипептида, получившего название апостатин. Проведены медико-биологические испытания на модели солидного варианта аденокарциномы Эрлиха, в результате которых показано, что апостатин обладает противоопухолевой

---

---

активностью, сходной с активностью эндостатина и сульфатированных полисахаридов (Попов и др., 2013).

Результаты масс-спектрометрического анализа свидетельствуют о высокой чистоте коллагенового белка, полученного из трепанга *A. japonicus*. Как показал сравнительный анализ аминокислотного состава апостатина и коллагенов, выделенных из других источников, для него характерно повышенное содержание отрицательно заряженных аминокислот – аспарагиновой и, особенно, глутаминовой, оксикислот – серина, треонина и, особенно, тирозина и валина. По содержанию глицина, оксипролина и пролина выделенный белок соответствует классическому коллагену. Апостатин обладал выраженной антикоагулянтной способностью, был нетоксичным, безопасным при длительном применении и обладал высокой растворимостью в биосовместимых жидкостях и растворах. На его основе могут быть разработаны антикоагулянтные препараты, косметические средства и биологически активные добавки к пище как средства профилактики и дополнительной терапии при заболеваниях опорно-двигательного аппарата и ухода за кожей (Артюков, 2012).

---

---

## ГЛАВА 5

### **БАД К ПИЩЕ НА ОСНОВЕ ИММУНОРЕГУЛЯТОРНЫХ НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫХ ПЕПТИДНЫХ ПРЕПАРАТОВ ИЗ НЕРВНОЙ ТКАНИ КАЛЬМАРОВ**

В последние годы кальмары, запасы которых в океанах достаточно велики, стали привлекать внимание ученых многих специальностей как богатый источник биологически активных веществ (БАВ). Было установлено, что БАВ, полученные из отходов переработки кальмаров, обладают антиоксидантными (Kim et al., 2013; Zhu, Hu, 2014), антигипертензивными (Zhu, Hu, 2014), ферментингибирующими (Choi et al., 2015), иммуномодулирующими (Беседнова, Эпштейн, 2004), противовоспалительными (Запорожец, 2006), антикоагулянтными (Кузнецова, 2009), противоинфекционными (Гажа, 1994), антибактериальными (Gomez-Guillen et al., 2011), антифунгальными (Girija et al., 2011) свойствами.

Отходы от разделки кальмаров (печень, гонады, остатки желудочно-кишечного тракта) являются сырьем с высоким содержанием жира. Жир из внутренностей кальмара, в том числе из печени, содержит различные полезные компоненты, в частности эйкозопентаеновую, декозопентаеновую и другие полиненасыщенные жирные кислоты, которые являются функциональными компонентами, защищающими организм от инфаркта миокарда, тромбоза сосудов мозга и других сердечно-сосудистых заболеваний (Kang et al., 2005). Предложено использовать жир кальмара при лечении термических ожогов и язвенной болезни.

В России разработаны технологии получения ацетилхолинэстеразы – фермента нервной проводимости из зрительных ганглиев кальмара, поскольку они содержат этот фермент в самых высоких концентрациях по сравнению с тканями других видов животных. Это свойство ганглиев впервые открыто Т. М. Турпаевым и др. (1968).

---

В дальнейшем была разработана технологическая схема получения препаратов холинэстеразы из сублимированных ганглиев дальневосточных видов кальмаров методом фракционирования сульфатом аммония с удельной активностью 106,0 Е/мг белка из ганглиев тихоокеанского кальмара и 93,1 Е/мг белка – из ганглиев кальмара Бартрама. Определена молекулярная масса холинэстераз, которая составляла 211–225 кДа в зависимости от вида кальмара (Михеев, 2009).

Источником биологически активных веществ могут служить молоки кальмара. Wahydi и S. M. Kim (2013) гидролизвали молоки трипсином при 50°C в течение 5 ч в 0,05М фосфатном буфере РН 8,0, после чего гидролизат подвергали ультрафильтрации через мембранные фильтры с диаметром пор 10,5 и 3 кДа. Полученные фракции исследовали на антиоксидантную и антиметаллопротеиназную активности, которые были значительно выше у фракции с более высокой молекулярной массой. Авторы предлагают использовать гидролизаты молок кальмара для создания продуктов функционального питания, а также как основу для создания лекарственных препаратов антиоксидантного и противовоспалительного действия.

Кожа кальмара является хорошим источником коллагена, на который у фармацевтов и косметологов существует большой спрос. Показано, что пептиды, полученные из триптического гидролизата кожи кальмара *Dosidicus gigas*, обладают высокой антиоксидантной активностью, – более высокой, чем природный антиоксидант альфа-токоферол (E. Mendis et al., 2005). Авторы описали два наиболее активных пептида со следующей характеристикой: Phe-Asp-Ser-Gly-Val-Leu (880 Да) и Asp-Gly-Pro-Leu-Gln-Ala-Gly-Glu-Arg (1241 Да) и предположили, что такая аминокислотная последовательность обуславливает их высокую антиоксидантную активность.

Л. Накчам и С. Ким (Nakchum, Kim, 2015) исследовали гидролизат из коллагена кожи кальмара на антигиалуронидазную, антитирозидазную и антиоксидантную активность. Выделено 5 фракций, одна из которых обладала сильнейшей антигиалуронидазной активностью. Преобладающими аминокислотами в ее составе были Gly, Val и Pro, молекулярная масса находилась в диапазоне от 3,4 кДа до 10 кДа. Способность фракции к хелатированию железа составляла почти 50% при концентрации 200 мкг/мл. Фракция ингибировала актив-

---

ность тирозиназы от 39,65% до 1 мг/мл. Кроме того, фракция обладала антигидроксилрадикальной активностью – более сильной, чем активность аскорбиновой кислоты. IC<sub>50</sub> фракции составляла 149,94 мкг/мл, IC<sub>50</sub> аскорбиновой кислоты – 212,94 мкг/мл. Полученные результаты позволили авторам рекомендовать гидролизат коллагена кожи кальмаров для разработки нутрицевтиков и косметических средств.

В настоящей монографии изложены результаты многолетних исследований большого коллектива авторов, которые детально исследовали медико-биологические свойства пептидов из нервной ткани кальмаров и разработали БАД к пище на его основе (Беседнова, Эпштейн, 2004; Запорожец, 2006; Кузнецова, 2009).

### *Пептиды ганглиев кальмаров.*

#### *Выделение и основные свойства*

В России впервые иммуноактивные пептиды из оптических ганглиев кальмара были получены коллективом авторов под руководством д.б.н. Л. М. Эпштейна (Эпштейн и др., 1982; Блинов и др., 1998; Бочаров и др., 2003; Боровская и др., 1996, 1999). Медико-биологические свойства этого препарата исследованы коллективом авторов под руководством академика РАМН д.м.н. Н. Н. Беседновой (Беседнова, Эпштейн, 2004; Запорожец, 2006; Кузнецова, 2009).

Известно, что БАВ, получаемые из гидробионтов, в том числе из кальмаров, обладают широким спектром биологической активности. Поскольку у кальмара нет специализированных органов иммунной системы, а нервная ткань представлена локальными образованиями, было сделано предположение, что за регуляцию физиологических функций головоногих моллюсков ответственны ганглии (окололоточный, центральный, оптический) и что именно в них нужно искать иммуотропные пептиды.

Для выделения таких пептидов был применен метод, основанный на экстракции в слабокислой среде водорастворимых компонентов. При этом происходит гидролиз белков при участии эндогенных ферментов с образованием пептидов и последующим извлечением их путем осаждения органическими растворителями. Далее производят повторную экстракцию и сублимирование конечного продукта. Этот способ извлечения целевых компонентов

положен в основу промышленной технологии, его использование обеспечивает легко масштабируемый процесс. Однако применение органических растворителей (ацетона) приводит к необходимости их утилизации, а получаемый целевой продукт содержит некоторое количество примесных белков.

В дальнейшем метод был модифицирован. Первоначально был предложен способ получения препарата без использования ацетона. В нем был сохранен исходный этап экстракции, однако отделение пептидных фракций осуществлялось методом ультрафильтрации – пропусканием раствора через селективные мембраны, имеющие размер пор, соответствующий молекулярной массе разделяемых веществ. При этом была использована ступенчатая ультрафильтрация, когда на первом этапе отделяются компоненты с молекулярной массой более 100 кДа, а на втором происходит одновременное удаление компонентов с молекулярной массой менее 1 кДа и концентрирование раствора.

При дальнейшем усовершенствовании технологии для увеличения выхода целевых компонентов было предложено проводить гидролиз исходной ткани с помощью экзогенных ферментов. Полученный таким способом препарат сохраняет качества, заложенные в нормативной документации, а именно критерии безопасности, идентичность, биологическую активность и др. Биологическая активность пептидов не различалась в зависимости от способа получения биопрепарата. Примером может служить исследование фагоцитозстимулирующей активности пептида, выделенного различными методами (Табл. 17). Как следует из материалов таблицы, фагоцитарная активность полиморфноядерных лейкоцитов по отношению к золотистому стафилококку экстракта и ферментолизата была сопоставимой.

Биологически активными компонентами полученного гидролизата являются регуляторные пептиды из нервной ткани кальмаров, образующиеся в результате ограниченного протеолиза пептидно-белковых предшественников. Эти соединения представляют собой необычные сочетания аминокислотных остатков и обладают значительной физиологической и биохимической активностью, выражающейся в способности к взаимодействию с иммуно- и нейрорегуляторами, ростовыми и трансформирующими факторами. Эволюционно

Таблица 17

**Фагоцитозстимулирующее действие пептидных препаратов из ганглиев кальмара, полученных разными способами**

Препарат	Доза, мкг/мл	ФП	ФЧ
Контроль	-	49,0 ± 2,1	1,75 ± 0,2
Экстракт	1	47,0 ± 3,2	2,00 ± 0,1
	0,1	51,0 ± 2,8	2,05 ± 0,4
	0,01	53,5 ± 4,2	2,30 ± 0,3
Ферментоллизат	1	47,5 ± 4,4	2,15 ± 0,1
	0,1	50,0 ± 2,1	2,05 ± 0,3
	0,01	53,5 ± 3,7	2,50 ± 0,4

*Примечание.* В качестве тест-микроба использован *Staphylococcus aureus*; ФЧ – фагоцитарное число – среднее число микроорганизмов, поглощенных одним полиморфноядерным лейкоцитом; ФП – фагоцитарный показатель – среднее число полиморфноядерных лейкоцитов, участвующих в фагоцитозе.

более древняя система биорегуляции у кальмаров обеспечивает широкий спектр биологической активности.

Исследования безопасности полученных гидролизатов проводили в соответствии с «Правилами доклинической оценки безопасности фармакологических средств» (Москва, 1991) в Пермском НИИВС.

В экспериментах по определению острой токсичности установлено, что ЛД<sub>50</sub> гидролизата составляет 2700 мг/кг. Изучение хронической токсичности проводили на белых крысах. В течение 3 мес. после введения препарата (срок наблюдения) не было падежа животных. По внешнему виду крысы, получившие гидролизат, ничем не отличались от особой контрольной группы. Как известно, интегральным показателем, характеризующим состояние животных, является масса тела. Как показали исследования, динамика массы тела опытных и контрольных крыс была практически одинаковой.

Исследование состояния периферической крови позволило установить, что на протяжении всего периода наблюдения ни одна из апробированных доз гидролизата (0,05; 5,0; 15,0 мг/кг) не изменила показатели красной крови. Наблюдали достоверное увеличение количества клеток белой крови в 1-й месяц введения биопрепарата в дозах 0,05 и 5,00 мг/кг как у самцов, так и у самок крыс.



---

Состояние сердечно-сосудистой системы у крыс, получавших гидролизат, не отличалось от такового у контрольных животных. Нарушения ритма сердечных сокращений у обследуемых животных в динамике не обнаружено.

Длительное введение различных доз гидролизата крысам не влияло на активность аланиламинотрансферазы и аспаратамино-трансферазы, не изменяло белоксинтезирующей функции печени и показателей углеводного обмена. При длительном его введении уровень глюкозы в сыворотке крови крыс не изменялся.

Выделительная функция почек не страдала. Содержание электролитов в плазме крови опытных крыс не отличалось от такового у контрольных животных. Длительное введение гидролизата ни в одной дозе не оказало существенного влияния на массу органов.

При макроскопическом исследовании органов крыс, получавших и не получавших гидролизат, отклонений от нормы не установлено. Исследование гистологической структуры органов и тканей подопытных животных по сравнению с контрольными крысами не выявило существенных структурных изменений. У животных, получавших гидролизат во всех дозах, количество и степень выраженности сопутствующей патологии (воспалительные процессы в разных органах) были гораздо ниже, чем у контрольных животных. Местно-раздражающее действие биопрепарата не установлено.

Таким образом, исследование токсичности гидролизата из нервной ткани кальмара, вводимого ежедневно в трех терапевтических дозах (ТД) (1; 100; 300 ТД) крысам Вистар (самцам и самкам) в течение 3 мес. показало, что он не оказывал отрицательного влияния на основные системы и органы животных. Не было отмечено каких-либо реакций через месяц после его отмены.

Шестимесячное ежедневное введение 100 и 300 ТД гидролизата самцам и самкам кроликов также не вызвало отрицательного воздействия на их организм.

Аллергенные свойства гидролизата исследовали на морских свинках, белых крысах и мышах. Во всех использованных концентрациях он не вызывал анафилактического шока и активной кожной анафилаксии у морских свинок, не индуцировал реакцию гиперчувствительности замедленного типа у мышей и морских свинок, не изменял количество циркулирующих в крови морских свинок

---

иммунных комплексов, не стимулировал дегрануляцию тучных клеток. Эти данные позволили сделать заключение о том, что гидролизат из нервной ткани кальмара не обладает аллергенными свойствами.

Одним из наиболее опасных свойств химических веществ является их тератогенное действие. В связи с этим на 7-дневных эмбрионах кур было исследовано тератогенное действие гидролизата, который вводили в желточный мешок в дозах 2,5; 25,0; 50,0 мкг/кг. Учет результатов проводили на 19-е сутки инкубации. В опытах по изучению эмбриотоксического и тератогенного действия установлено отсутствие отрицательного влияния гидролизата на развитие плода и на постнатальное развитие особи. Анализ динамики развития цыплят показал отсутствие достоверной разницы между опытом и контролем. Постнатальная гибель наблюдалась в единичных случаях и была сравнима с контролем.

#### *Противовоспалительная активность пептидов нервной ткани кальмаров*

В экспериментах на беспородных белых крысах и мышах исследована противовоспалительная и анальгетическая активность пептидов. Установлено, что пептиду, вводимому подкожно за 1 ч до субплантарной инъекции агара, присуще противовоспалительное действие. Оно проявилось в торможении агарового отека на 52,3% через 3 ч и на 32,2% – через 5 ч. Выявление противовоспалительного действия пептидов осуществлено также с учетом его воздействия на иммунную систему, изменения которой обычно регистрируются на 4–7-е сутки после введения. Для этой цели агаровый отек моделировали в указанные сроки. Установлено, что при введении гидролизата на 5-е сутки воспалительного процесса он оказывал флоголитическое действие. Это, по-видимому, является следствием активации гуморального звена иммунитета. Последнее подтверждалось обнаружением в сыворотках крови крыс антисеротониновых и антигистаминовых антител.

Поскольку биопрепарат позиционирован в качестве иммуномодулятора, в экспериментах было исследовано его действие на клеточные и гуморальные факторы врожденного и адаптивного иммунитета.

### Влияние пептидного препарата на гуморальный иммунитет

Как известно, антитела при ряде инфекционных заболеваний играют защитную роль. В то же время многие патогенные микроорганизмы являются слабыми антигенами и не обеспечивают достаточно сильной гуморальной защиты организма. Ранее было известно, что пептиды обладают способностью ускорять появление и увеличивать титры антител, синтезирующихся в ответ на антигенный стимул, а также проявлять адьювантный эффект при вакцинации (Ярилин, 1999).

Парентеральное введение пептидов из нервной ткани кальмаров мышам, иммунизированным эритроцитами барана (ЭБ) за 1 сут до иммунизации, приводило к активной иммунной реакции, выражающейся в повышении титров IgM-антител. Стимуляция продукции антител была умеренной: титры гемагглютининов и гемолизинов превышали контрольные показатели в 1,2–1,8 раза. Первичный гуморальный иммунный ответ на введение гидролизата характеризовался следующими показателями: титр гемагглютининов составил  $12,4 \pm 0,3 \log_2$ ,  $p = 0,000$ ; титр гемолизинов –  $9,3 \pm 0,45 \log_2$ ,  $p = 0,002$ . Под действием пептида отмечено более раннее выявление уровня антител, близкого к максимальному по сравнению с таковым в группе контрольных животных. Высокий уровень IgM-антител у мышей, получавших биопрепарат, удерживался в течение 3 нед. Через 4 дня после внутрибрюшинной инъекции гидролизата в селезенке мышей накапливалось  $322 \pm 44$  ( $p = 0,001$ ) АОК  $\times 10^6$  при введении пептида в индуктивную фазу и  $381 \pm 71$  ( $p \pm 0,004$ ) АОК  $\times 10^6$  в фазу антителообразования. Индекс стимуляции продукции антителообразующих клеток составил 2,6.

Таким образом, комплекс пептидов при парентеральном введении мышам увеличивал количество В-лимфоцитов мышей, усиливал иммунную реакцию на антиген при введении как в индуктивную, так и в продуктивную фазы антителогенеза. Влияние гидролизата на клеточный иммунитет оценивали по изменению пролиферации лимфоцитов – *in vitro* в реакции бласттрансформации (спонтанной и индуцированной митогенами) и *in vivo* в реакции гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ) (на стадиях сенсибилизации и разрешения). Митогенного эффекта не зафиксировано.

Что касается реакции ГЗТ, то гидролизат тормозит ее развитие при введении в обе фазы иммунного ответа в минимальных дозах ( $0,005$  и  $0,05$  мг/кг). Процент прироста массы лапы составил  $16,0 \pm 1,85$ ,  $p = 0,001$  и  $18,1 \pm 1,75$ ,  $p < 0,001$  соответственно. В контрольной группе этот показатель был равен  $29,7 \pm 1,0$ . В высокой дозе ( $5$  мг/кг) препарат не влиял на показатели этой реакции.

Установлено, что гидролизат обладал ингибирующей активностью в отношении реакции трансплантат против хозяина. Важным его свойством явилось отсутствие у него митостатической и лимфотоксической активности.

Основным проявлением иммунодефицитов является повышенная инфекционная заболеваемость. Поэтому основная цель применения иммуномодуляторов – усиление антиинфекционной резистентности организма и, главное, стимуляция клеток моноцитарно-макрофагальной системы, нейтрофилов и нормальных киллеров, которые принимают участие в создании неспецифической резистентности организма и реализуют ранний ответ на проникающие в организм микробы. Как показали эксперименты, гидролизат из нервной ткани кальмара обладал способностью модулировать функциональную активность этих клеточных элементов. Характер и выраженность ответа клеток зависели от дозы, а также исходного состояния клетки (норма, депрессия).

Гидролизат усиливал локомоторные функции нейтрофилов. Хемотаксическую активность нейтрофилов исследовали по изменению количества клеток в брюшной полости мышей в ответ на введение пептида в дозе  $0,01$  мг/мл. Через 24 ч после внутрибрюшинного введения гидролизата в перитонеальной полости наблюдалось увеличение общего количества клеток (в контроле –  $9,4 \pm 1,2$  КПЭ ( $10^6$ ); у мышей, получивших гидролизат, –  $18,8 \pm 2,1$ ,  $p < 0,003$ ; из них  $10,0 \pm 2,9$ ,  $p < 0,008$  КПЭ ( $10^6$ ). Стимуляция хемотаксической активности нейтрофилов пептидами демонстрирует их участие в реализации ключевого этапа в системе защиты организма от внедрения микроорганизмов.

Особенно ярко проявляется стимулирующее действие гидролизата на фагоцитарные процессы (как поглощение объектов, так и их переваривание) в макрофагах и полиморфноядерных лейкоцитах (ПМЯЛ). Для исследования влияния на процесс фагоцитоза его вво-

дили мышам подкожно в дозах 5,0 и 0,005 мг/кг. Во все исследуемые сроки (до 21 дня) фагоцитарная активность ПМЯЛ животных, получивших гидролизат, оставалась на значительно более высоком уровне по отношению ко всем исследуемым микроорганизмам, чем в контрольной группе. Наиболее высоких значений достигали показатели фагоцитоза по отношению к возбудителям псевдотуберкулеза и сальмонеллеза (в 3,0–3,5 раза увеличилось число клеток, участвующих в фагоцитозе, в 2,5–3,0 раза возросло количество микроорганизмов, поглощенных одним фагоцитом). Поглощительная активность ПМЯЛ по отношению к синегнойной палочке (этот микроорганизм слабо фагоцитируется этими клетками) также повышалась. ФП на 10-й день составлял  $36 \pm 3,2\%$ , ФЧ –  $2,7 \pm 0,1$ , в контроле ФП был равен  $11 \pm 0,7\%$ , ФЧ –  $0,5 \pm 0,01$ . Показатели завершенности фагоцитоза этого возбудителя по сравнению с контролем также повышались (на 10-й день они достигли  $36 \pm 3,2\%$ ). Даже такое увеличение показателей завершенности имеет большое значение, если учесть тот факт, что в контроле фагоцитоз был незавершенным.

При пероральном введении мышам гидролизата в течение 10 дней показатели фагоцитоза по отношению ко всем взятым в эксперимент тест-микробам также возрастали.

При обработке полиморфноядерных лейкоцитов (ПМЯЛ) мышей контрольной группы циклофосфаном способность к фагоцитозу патогенных микроорганизмов резко снижалась (ФП с  $67 \pm 12\%$  в контроле до  $32 \pm 6,3\%$ , ФЧ с  $3,1 \pm 0,5$  в контроле до  $0,56 \pm 0,1$ ). Пептид восстанавливал и значительно усиливал сниженную циклофосфаном фагоцитарную активность ПМЯЛ (ФП повышался до  $75 \pm 9,5\%$ , ФЧ возрастало до  $6,8 \pm 2,2$ ).

Таким образом, биопрепарат значительно усиливает процессы поглощения патогенных микроорганизмов и уничтожения их в ПМЯЛ как здорового, так и иммунокомпрометированного организма.

Благодаря различным механизмам мононуклеарные клетки играют важную роль в защите организма, оказывая значительное влияние на окружающие клеточные элементы и ткани как в норме, так и при патологии. Это определяет значение разработки препаратов, которые способны усиливать генерацию клеток системы мононуклеарных фагоцитов (СМФ) и повышать их функциональную активность.

Особое значение фагоцитоз и необходимость его усиления приобретают при инфекционных процессах, вызываемых факультативными внутриклеточными паразитами (сальмонеллами, иерсиниями и др.), для которых макрофаги являются местом их преимущественного размножения и сохранения.

Ультраструктурные особенности макрофагов, инкубированных с гидролизатом нервной ткани кальмара, свидетельствуют о стимуляции их функционального состояния, что проявлялось отчетливыми изменениями поверхностной мембраны клеток с образованием многочисленных псевдоподий, дисперсией хроматина и расширением ядерных пор, появлением признаков повышения белоксинтетических и биоэнергетических процессов.

Результаты применения сканирующей электронной микроскопии также свидетельствуют об активации макрофагов исследуемым гидролизатом.

Влияние пептидов на интенсивность фагоцитоза исследовали на культурах перитонеальных МФ, инфицированных *Y.pseudotuberculosis*, *S.aureus*, *P.aeruginosa*. Биопрепарат значительно активизирует бактерицидную функцию макрофагов, вследствие чего эти клетки быстро (в течение 12 ч) уничтожают поглощенные микроорганизмы. В интактных же макрофагах фагоцитоз перечисленных возбудителей носит незавершенный характер.

Пероральное введение гидролизата из нервной ткани кальмара сопровождалось усилением фагоцитарных процессов в макрофагах. Так, ФП макрофагов морских свинок, получивших пептид, через 1 ч после заражения культуры возбудителем псевдотуберкулеза составил  $86 \pm 4,1\%$  (в контроле –  $23 \pm 2,7$ ). ФЧ для этих клеток в тот же срок составило  $4,4 \pm 0,6$  (в контроле –  $1,9 \pm 0,2$ ).

Стимулирующее влияние пептидов на систему фагоцитов проявляется и в усилении фагоцитарной активности макрофагов печени и селезенки, основных участников очищения кровотока от инородного материала. Эксперименты по клиренсу крови от частиц коллоидной туши показали, что через 24 ч после перорального введения пептида в дозе 0,1 мкг/мышь скорость очищения кровотока у мышей увеличилась в 1,8 раза. Полученные данные свидетельствуют о том, что гидролизат может применяться в качестве иммунокорректора при заболеваниях, сопровождающихся дефектами фагоцитоза.

Биопрепарат в дозах 0,05 и 0,005 мг/кг защищал 80 % мышей от смертельной инфекции, вызванной *Salmonella typhimurium*, 76,2 % мышей – от смертельной дозы термостабильного псевдотуберкулезного токсина при гибели 100 % животных контрольной группы.

Было изучено влияние пептидов на спонтанную и стимулированную продукцию цитокинов, вырабатываемых мононуклеарными фагоцитами – фактора некроза опухоли (ФНО), интерлейкинов 1 и 8 (ИЛ-1, ИЛ-8) – Th1 (ИЛ-2, интерферон-) и Th2 (ИЛ-4). При этом они проявляли свойства мультицитокинового индуктора. В их действии на клетки периферической крови преобладает регуляторный эффект: исходно низкая продукция цитокина усиливается, исходно высокая снижается. Биопрепарат обладает способностью к преимущественной индукции противовоспалительных цитокинов.

В целом результаты, представленные выше, убедительно демонстрируют способность пептидов из нервной ткани кальмаров модулировать неспецифические факторы резистентности организма и оказывать влияние на формирование специфического иммунного ответа путем индукции экспрессии ряда регуляторных цитокинов иммунокомпетентными клетками, что в значительной степени определяет их эффективность в качестве иммуномодулирующего компонента при состояниях, сопровождающихся развитием вторичной иммунологической недостаточности.

Гидролизат избирательно индуцировал апоптоз в популяциях лейкозных клеток перевиваемых клеточных линий Н9 (Т-клеточная лейкемия человека) (15,3 ± 139 %, контроль 6,4 ± 1,2 %) и NB4 (про-миелоциты) (13,6 ± 1,9 %, контроль 3,6 ± 1,9 %). При этом он не оказывал влияния на спонтанный (контроль 11,5 ± 1,4 %, препарат 11,0 ± 1,0 %) и индуцированный митогенами (контроль 20,4 ± 2,1 %, препарат 17,6 ± 2,0 %) апоптоз лимфоцитов периферической крови. В условиях иммунодепрессии внесение его в культуру лимфоцитов вызывало отмену апоптоза, индуцированного дексаметазоном (интактные клетки 11,2 ± 2,1 %, дексаметазон 18,5 ± 1,9 %, препарат + дексаметазон 7,0 %).

Индукция гидролизатом нервной ткани кальмара апоптоза в опухолевых клетках может являться одним из возможных механизмов, опосредующих противоопухолевую активность этого пептида, и служить основанием для возможного его изучения в качестве средства

терапии злокачественных новообразований. Способность отменять действие индуктора апоптоза, в частности дексаметазона, проявляя тем самым антиапоптогенные свойства, может являться фактором, обеспечивающим защитный эффект пептида в условиях иммунодепрессии.

*Действие пептидного препарата из нервной ткани кальмара на уровень  $\gamma$ -интерферона в плазме крови животных, получивших ксенобиотики*

Н. В. Степаненко (2004) исследован характер влияния пептидов на синтез  $\gamma$ -интерферона ( $\gamma$ -ИФН) в условиях интоксикации организма солями тяжелых металлов. Прежде всего показана временная и дозозависимая способность препарата стимулировать у интактных мышей продукцию  $\gamma$ -ИФН (табл. 18, 19). Если в дозе 0,1 мг/кг через 24 ч препарат вызывал повышение уровня цитокина у животных на 86 % по сравнению с интактными мышами, то уже через 48 ч при введении в той же дозе этот показатель снижался на 79 % ( $p < 0,05$ ).

Таблица 18

**Влияние пептидов нервной ткани кальмара на концентрацию  $\gamma$ -интерферона в плазме крови мышей ( $M \pm m$ ) (Степаненко, 2004)**

Группа животных	Доза, мг/кг режим введения	Время определения от начала опыта, ч	$\gamma$ -интерферон в плазме крови, пг/мл
Контроль			77,8 ± 2,74
Препарат	0,1, однократно, внутрь	24	241,0127,64*
Препарат	То же	48	49,4 ± 4,32*
Препарат	— “ —	72	138,5 ± 14,12*
Препарат	0,1, однократно, п/к	24	145,3 ± 16,63*
Препарат	То же	48	15,9 ± 1,69*
Препарат	— “ —	72	344,8 ± 23,66*
Препарат	0,005, однократно, п/к	24	184,2 ± 20,74*
Препарат	То же	48	41,1 ± 3,97*
Препарат	— “ —	72	168,3 ± 17,93*

\* Различия статистически значимы по сравнению с контролем ( $p < 0,05$ ).

Таблица 19

Влияние некоторых цитостатиков и преднизолона, а также их комбинаций с препаратом на уровень  $\gamma$ -интерферона в плазме крови мышей ( $M \pm m$ ) (Степаненко, 2004)

Группа животных	Доза, режим введения	Время определения от начала опыта, сут	$\gamma$ -интерферон в плазме крови, пг/мл
Контроль			75,6 $\pm$ 2,58
Циклофосфан	100 мг/кг/сут, п/к	14	48,6 $\pm$ 4,56*
Циклофосфан + препарат	0,005 мг/кг/сут, внутрь	14	120,9 $\pm$ 8,56**
Преднизолон	30 мг/кг, 1 раз в 2 дня	14	51,7 $\pm$ 3,56*
Преднизолон + препарат	0,005 мг/кг/сут, внутрь	14	115,7 $\pm$ 9,45**

\* Различия статистически значимы по сравнению с контролем ( $p < 0,05$ ).

\*\* Различия статистически значимы по сравнению с группой животных, получавших только ксенобиотик ( $p < 0,05$ ).

Введение пептидов в дозе 0,005 мг/кг вызывало подъем уровня  $\gamma$ -интерферона в плазме крови мышей на 137% через 24 ч после введения пептида с последующим снижением на 46,9% через 48 часов ( $p < 0,05$ ). Применение биопрепарата в дозах 0,005 или 0,1 мг/кг приводило к увеличению концентрации  $\gamma$ -интерферона в 2,1 и 4,4 раза через 72 ч соответственно.

Таким образом, в иммунокомпетентном организме гидролизат из нервной ткани кальмара обуславливает повышение уровня  $\gamma$ -интерферона в сыворотке крови.

Исследования показали, что одним из механизмов действия пептидов на иммунокомпетентные клетки является индукция синтеза ИФН- $\gamma$ . Кроме того, изучено его влияние на образование  $\gamma$ -ИФН в условиях хронического воздействия на организм различных ксенобиотиков. У контрольных животных моделировали угнетение  $\gamma$ -интерфероногенеза преднизолоном, цитостатиками или солями тяжелых металлов – хлоридом кадмия или ацетатом свинца. Опытные группы одновременно с введением ксенобиотиков получали пептид.

Преднизолон достоверно ингибировал синтез  $\gamma$ -ИФН. На фоне введения пептидов в условиях иммунодепрессии, вызванной преднизолоном, уровень  $\gamma$ -ИФН увеличился в 2,2 раза относительно показателей у мышей, не получавших пептид. Близкие результаты получены при введении гидролизата в условиях циклофосфановой депрессии. При хронической интоксикации организма мышей солями тяжелых металлов введение пептида стимулировало синтез  $\gamma$ -ИФН (Табл. 20).

Таблица 20

Влияние пептидов из нервной ткани кальмара на уровень  $\gamma$ -интерферона в плазме крови мышей в условиях интоксикации солями тяжелых металлов ( $M \pm m$ ) (Степаненко, 2004)

Группа животных	Доза, режим введения	Время определения от начала опыта, дней	$\gamma$ -интерферон в плазме крови, пг/мл
Контроль			73,6 $\pm$ 3,56
Кадмий	3 мг/кг 1 раз в 2 дня	16	36,6 $\pm$ 4,12*
Кадмий + препарат	0,005 мг/кг/сут, внутрь	16	55,0 $\pm$ 9,73**
Свинец	50 мг/кг, 1 раз в 2 дня	16	22,2 $\pm$ 3,08*
Свинец + препарат	0,005 мг/кг/сут, внутрь	16	98,5 $\pm$ 9,7**

\* Различия статистически значимы по сравнению с контролем ( $p < 0,05$ ).

\*\* Различия статистически значимы по сравнению с группой животных, получавших только ксенобиотик ( $p < 0,05$ ).

### *Экспериментальное обоснование возможности клинического применения препарата при клещевом энцефалите*

В НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.П. Сомова исследована противовирусная активность пептидов из нервной ткани кальмара по отношению к вирусу клещевого энцефалита (КЭ) для обоснования возможности его применения в комплексной терапии клещевого энцефалита (Крылова, 2014).

Для сравнительного изучения противовирусной активности пептидов использованы официальные препараты, применяющиеся при терапии клещевого энцефалита: иммуноглобулин против КЭ,

рибавирин (химиопрепарат), рекомбинантный IFN $\alpha$  (реаферон-ЕС) и индукторы эндогенных IFN $\alpha/\beta$  (циклоферон и 4-йодантипирин). Согласно требованиям Фармкомитета РФ по доклиническому изучению новых лекарственных средств исследование противовирусной активности пептидов проводили на моделях *in vitro* и *in vivo*.

Изучали цитотоксичность исследуемых препаратов по воздействию их различных концентраций (1; 10; 100; 1000 мкг/мл) на интактную культуру клеток СПЭВ. Максимально переносимая концентрация, составляющая максимальной концентрации препарата, не оказывающей на клетки токсичного действия для всех изучаемых препаратов была МПК  $\geq 1000$  мкг/мл, т.е. они практически были нетоксичны для используемой культуры клеток.

Противовирусную активность исследуемых препаратов *in vitro* оценивали по эффективности подавления репликации вируса КЭ в культуре клеток СПЭВ, инфицированных высоковирулентным штаммом Dal вируса КЭ. Протективное действие препаратов *in vivo* исследовалось при моделировании летальной вирусной инфекции у неинбредных мышей, инфицированных штаммом Dal вируса КЭ в дозе 100 LD<sub>50</sub>. Использована лечебная схема введения изучаемых препаратов, т.е. через 1 ч после заражения.

Исследования, проведенные на модели *in vitro* (Крылова, 2014), показали, что только рибавирин в концентрации 500 мкг/мл и цельный иммуноглобулин против КЭ полностью подавляют репродукцию вируса КЭ в культуре клеток. Внесение в культуру клеток 250 мкг/мл рибавирина или противоклещевого иммуноглобулина (в разведении 1:10), или 125 мкг/мл циклоферона снижало инфекционный титр вируса на 4,5–5,0 lg ТЦД<sub>50</sub>/мл (Ки = 75–83%). Максимальные концентрации других референс-препаратов (реаферон-ЕС – 10<sup>4</sup> МЕ/мл, 4-йодантипирин – 1000 мкг/мл) вызывали снижение титров вируса на 3,0–3,5 lg ТЦД<sub>50</sub>/мл (Ки = 50–60%). Для пептидов из нервной ткани кальмара максимальный коэффициент подавления цитопатической активности вируса КЭ составил 58,3 (50,0–66,7)%. Указанный уровень подавления репликации вируса зарегистрирован при использовании пептида в невысоких концентрациях – 100 и 10 мкг/мл, соответственно (табл. 21).

Минимально эффективная вирусингибирующая концентрация (МЭК), снижающая титр вируса не менее чем на 2 lg ТЦД<sub>50</sub>, для пептидов составляла 0,1 мкг/мл.

Таблица 21

Оценка влияния пептидов из нервной ткани кальмара на репродукцию вируса КЭ в культуре клеток СПЭВ (Крылова, 2014).

Препарат	Концентрация препарата, мкг/мл	Титр вируса, lg ТЦД <sub>50</sub> /мл	Подавление репродукции вируса, Δ lg ТЦД <sub>50</sub> /мл	Коэффициент ингибирования (Ки), %
Вирус (контроль)	-	6,0 (5,5–7,0)	-	-
Иммуноглобулин против КЭ	Цельный	0	6,0 (5,5–6,5)	100
	1:10	1,0 (0,9–1,2)	5,0 (4,8–5,3)	83,3 (81,5–87,3)
	1:100	2,0 (1,8–2,1)	4,0 (3,7–4,3)	66,7 (65,1–68,5)
	1:1000	2,3 (2,0–2,5)	3,7 (3,5–4,0)	61,7 (58,5–63,6)
Рибавирин	500	0	6,0 (5,5–6,5)	100
	250	1,0 (0,8–1,2)	5,0 (4,7–5,3)	83,3 (81,5–85,5)
	125	2,0 (1,8–2,3)	4,0 (3,7–4,2)	66,7 (62,1–70,0)
	62	3,1 (2,8–3,3)	2,9 (2,7–3,2)	50,0 (47,0–53,1)
	31	4,0 (3,8–4,3)	2,0 (1,7–2,2)	33,3 (28,2–36,7)
Реаферон-ЕС	10 <sup>4</sup> МЕ/мл	2,5 (2,0–3,0)	3,5 (3,0–4,0)	58,3 (50,0–66,7)
	10 <sup>3</sup> МЕ/мл	3,0 (2,7–3,2)	3,0 (2,8–3,3)	50,0 (46,7–55,0)
	10 <sup>2</sup> МЕ/мл	4,1 (3,8–4,5)	1,9 (1,7–2,0)	31,6 (28,3–33,3)
	10 МЕ/мл	5,0 (4,6–5,2)	1,0 (0,9–1,3)	16,7 (15,0–21,7)

Препарат	Концентрация препарата, мкг/мл	Титр вируса, lg ТЦД <sub>50</sub> /мл	Подавление репродукции вируса, Δ, lg ТЦД <sub>50</sub> /мл	Коэффициент ингибирования (Ки), %
Циклоферон	125	1,5 (1,2–1,8)	4,5 (4,3–4,7)	75,0 (71,7–78,3)
	60	3,0 (2,6–3,4)	3,0 (2,9–3,1)	50,0 (48,3–52,7)
	12,5	3,9 (3,5–4,2)	2,1 (1,8–2,4)	35,0 (30,0–40,0)
	6,0	0	0	
4-йодантипирин	1000	3,0 (2,7–3,2)	3,0 (2,8–3,3)	50,0 (46,7–55,0)
	100	4,2 (3,8–4,4)	1,8 (1,6–2,2)	30,0 (26,7–36,7)
	10	5,0 (4,6–5,2)	1,0 (0,9–1,3)	16,7 (15,0–21,7)
	1	6,0	0	0
Пептидный препарат	100	4,0 (3,5–4,5)	2,0 (1,5–2,5)	33,3 (25,0–41,6)
	10	2,5 (2,0–3,0)	3,5 (3,0–4,0)	58,3 (50,0–66,7)
	1	3,3 (3,0–3,5)	2,7 (2,5–3,0)	45,0 (41,7–50,0)
	0,1	3,9 (3,5–4,2)	2,1 (1,8–2,4)	35,0 (30,0–40,0)

**Примечания.** Препараты вносили через 1 ч после инфицирования культуры клеток штаммом Dal вируса КЭ. Снижение уровня накопления вируса под влиянием препарата Δ (lg) = Ак – Ао, где Ак – уровень накопления вируса без внесения препарата, Ао – уровень накопления вируса с препаратом. Коэффициент ингибирования Ки (%) = (Ак – Ао) / Ак × 100 %.

Известно, что комбинированное использование противовирусных препаратов, имеющих различную химическую структуру и принципиально различный механизм действия, приводит к усилению антивирусного эффекта аддитивного или синергидного характера. В связи с этим было изучено противовирусное действие сочетанного применения химиопрепарата – рибавирина и пептидов кальмара в инфицированной вирусом КЭ культуре клеток СПЭВ.

Монопрепараты применялись в минимально эффективных вирусингибирующих концентрациях, снижающих накопление вируса КЭ на 2 lg ТЦД<sub>50</sub>/мл.

Установлено, что комбинированное использование рибавирина и пептидов (в соотношении 1:1) в указанных минимальных концентрациях снижало титр вируса КЭ на 4,1 (3,7–4,5) lg ТЦД<sub>50</sub>/мл, подавляя репродукцию вируса на 68,3 (62–75)%, т.е. эффект комбинации препаратов имеет аддитивный характер. Полученные данные свидетельствовали о целесообразности изучения *in vivo* как самого препарата пептидов *per se*, так и совместного применения пептида с официальным препаратом – рибавирином.

Было исследовано и протективное действие пептидов при КЭ по сравнению официальными препаратами сравнения. На модели острой летальной инфекции мышей показано, что животные, не получавшие препаратов (контрольная группа) погибали, начиная с 9-х суток (СПЖ составила  $9,8 \pm 1,9$  дней) (табл. 22). Наибольший защитный эффект в отношении вируса КЭ зарегистрирован при применении 0,25 мл/кг противоклещевого иммуноглобулина. Однократное введение этого препарата после заражения животных защищало от гибели  $45,0 \pm 8,0\%$  мышей, средняя продолжительность жизни животных (СПЖ) увеличивалась на 6,4 дня по сравнению с контрольной группой ( $z=3,646$ ,  $a=0,000$ ). Выживаемость мышей, получавших пептиды из нервной ткани кальмара, а также индуктор интерферона – циклоферон, значимо отличалась от таковой у нелеченых животных ( $z > 1,960$ ,  $a \leq 0,05$ ). Эти препараты защищали от гибели в среднем 25–35% животных, увеличивая СПЖ на 2,7–4,7 дней (табл. 22). Наименьшее протективное действие продемонстрировали рибавирин, реаферон-ЕС и 4-йодантипирин: в указанных дозах эти препараты защищали около 5–15% инфицированных животных, удлиняя срок их жизни лишь на 0,8–2,0 дня по сравнению с контрольной группой ( $z \leq 1,960$ ,  $a > 0,05$ ).

Выживаемость животных, инфицированных вирусом КЭ, при лечебной схеме введения препаратов (Крылова, 2014)

Препарат	Способ и кратность введения препаратов	Дозы препаратов	Кол-во выживших животных, %	СПЖ, дни	Логранговый критерий z
Рибавирин	Перорально 10 дней	50 мг/кг	5,0 ± 1,0	10,8 ± 2,0	$z = 0,891, a = 0,346$
		100 мг/кг	13,3 ± 3,2	11,8 ± 2,4	$z = 1,516, a = 0,130$
		200 мг/кг	0	9,1 ± 1,8	$z = 0,379, a = 0,744$
Противоклещевой иммуноглобулин	Внутримышечно однократно	0,15 мл/кг	30,0 ± 5,0	13,9 ± 2,8	$z = 2,240, a = 0,029$
		0,25 мл/кг	45,0 ± 8,0	16,2 ± 3,2	$z = 3,646, a = 0,000$
Реаферон – ЕС	Внутримышечно 5 дней	10 <sup>3</sup> МЕ/кг	0	10,0 ± 2,0	$z = 0,936, a = 0,875$
		10 <sup>4</sup> МЕ/кг	5,0 ± 1,0	10,6 ± 2,1	$z = 0,771, a = 0,441$
Циклоферон	Внутримышечно 5 дней	0,6 мг/кг	0	10,2 ± 2,0	$z = 0,399, a = 0,711$
		6 мг/кг	21,7 ± 4,3	12,3 ± 2,5	$z = 2,065, a = 0,039$
		60 мг/кг	35,0 ± 8,0	14,5 ± 2,8	$z = 2,490, a = 0,013$
4-йодантипирин	Перорально 5 дней	1,25 мг/кг	0	10,0 ± 2,0	$z = 0,936, a = 0,875$
		12,5 мг/кг	15,5 ± 3,1	11,5 ± 2,3	$z = 1,020, a = 0,308$
Пептидный препарат	Подкожно 5 дней	5 мкг/кг	23,3 ± 5,8	12,5 ± 2,5	$z = 2,080, a = 0,041$
		50 мкг/кг	10,0 ± 2,0	11,0 ± 2,8	$z = 1,056, a = 0,411$
Контроль вируса (без препаратов)			0	9,8 ± 1,9	

Примечания. z – логранговый критерий выживаемости с поправкой Йейтса, характеризует различия в выживаемости животных опытной и контрольных групп (1,960 – критическое значение для уровня значимости 0,05); a – уровень значимости различий в выживаемости животных двух групп; n = 30 животных (в каждой группе).

Изучение сочетанного применения рибавирина и циклоферона с пептидами при остром летальном КЭ у мышей показало, что комбинация официальных препаратов с иммуномодулятором значительно повышает выживаемость животных и срок их жизни по сравнению с таковыми в контрольной группе (% выживших животных –  $33,3 \pm 6,7$ ; СПЖ –  $13,8 \pm 2,5$  дней). Совместное применение рибавирина с пептидами ( $z_2 = 2,060, a = 0,043$ ) более эффективно, чем монотерапия рибавирином ( $z = 1,516, a = 0,130$ ) (% выживших мышей –  $13,3\%$ ; СПЖ –  $11,8 \pm 2,4$  дней). В то же время эффективность комбинации иммуномодулятора с рибавирином значительно не отличалась от монотерапии препаратом пептидов ( $z_1 = 0,316, a = 0,752$ ). Наиболее эффективной оказалась комбинация циклоферона с пептидом, которая значительно превышала таковую каждого монопрепарата ( $z > 1,960, a \leq 0,05$ ) (% выживших животных –  $50,0 \pm 5,0\%$ ; СПЖ –  $15,9 \pm 3,0$  дней). Таким образом, установлено, что комбинация препаратов с различным механизмом действия (препарат пептидов с рибавирином и циклофероном) оказывает выраженный защитный эффект аддитивного характера, и этот факт свидетельствует о перспективности использования пептидов из нервной ткани кальмара в комплексе лечения клещевого энцефалита.

Результаты изучения механизмов действия исследуемых пептидов из нервной ткани кальмаров на врожденный и адаптивный иммунитет (Беседнова, Эпштейн, 2004; Запорожец, 2006; Кузнецова, 2009) явились экспериментальным обоснованием возможности и целесообразности применения этой БАД к пище в комплексе лечения различных болезней.

#### *Клинические эффекты пептидного препарата из нервной ткани кальмаров*

Иммунитет – совокупность функций организма, направленных на его защиту от всего генетически чужеродного. Речь идет не только о внешних врагах – вирусах, паразитах, аллергенах и др. При определенных условиях даже собственные клетки организма могут стать чуждыми ему – например, когда претерпевают мутации или стареют. А то, что генетически противоестественно, представляет опасность. Задача иммунитета – защитить организм от любой агрессии, независимо от того, откуда она исходит. Как правило, любое заболевание



---

---

сопровождается иммунной недостаточностью. Цель терапии таких состояний – продуманная и осторожная коррекция. В этом разделе монографии изложены результаты коррекции иммунологических нарушений организма при помощи исследуемого биопрепарата.

#### *Влияние пептидного препарата на холинэстеразную активность и перекисное окисление липидов крови*

В целях изучения влияния пептидов на биосинтетические и метаболические процессы в нервной ткани, а также на состояние перекисного окисления липидов (ПОЛ) исследована активность холинэстеразы (ХЭ) методом Элмана и содержание малонового альдегида (МДА) в крови пациентов в возрасте от 26 до 45 лет (Романенко и др., 2000). Оценку действия гидролизата проводили до и после 10-дневного курса его приема по 0,02 г 3 раза в день и через 1 мес. после прекращения приема на фоне обычного пищевого рациона. Исследованием установлено снижение уровня МДА на 23% при сохранении на 17% ниже исходного уровня через 1 мес. после прекращения приема пептида. Снижение ПОЛ под влиянием гидролизата свидетельствует о его антиоксидантной активности или об активации механизмов антиоксидантной системы организма. Активность ХЭ под действием пептида имела выраженный пик  $62,8 \pm 1,3$  мкм/мл, сохраняясь на повышенном уровне до  $34,0 \pm 1,8$  мкм/мл по отношению к исходному, равному  $11,85 \pm 1,4$  мкм/мл. Полученные данные свидетельствуют о том, что пептиды в указанных дозах оказывает активирующее влияние на холинэргические структуры и ингибирующее – на процессы пероксидации.

#### *Использование пептидного препарата при онкологических заболеваниях*

Исследование эффективности пептидов из нервной ткани кальмара в онкологической практике проведено на кафедре онкологии ВГМУ (Лихобабин и др., 1996). Первоначально были выбраны два заболевания: рак почки и злокачественная меланома, диссеминированные процессы. Это обусловлено следующим: 1) к моменту установления характера заболевания или же его прогрессии выявлялась иммунодепрессия, как правило 2-й или 3-й степени; 2) больные под-

---

---

лежали длительному специфическому противоопухолевому лечению препаратами, снижающими иммунную защиту; 3) необходимостью симптоматической терапии (особенно безынъекционной формы) для уменьшения проявлений побочных эффектов лучевой и цитостатической терапии. Обсуждаются результаты лечения тех пациентов, которые получили не менее 4 курсов препарата. Стандартная доза пептида составляла 2 мг ежедневно в течение 10 дней. Курсы лечения проводились регулярно в период специального лечения. Получены следующие результаты. У 5 из 6 больных с первичным раком почки и распространенной меланомой проведенный курс препарата на фоне подготовки к операции позволил сократить предоперационный период до 4–6 дней (в контроле – 8–10 дней). У 16 больных с распространенной меланомой в процессе цитостатического лечения пептид применяли в период подготовки к химиотерапии. У 14 пациентов клинический эффект препарата оказался особенно выраженным: угнетение кроветворения в виде снижения числа лейкоцитов и тромбоцитов отмечалось только после 5-го курса пептида. У 10 пациентов с диагнозом рак почки проводимая терапия пептидом в период послеоперационной лучевой терапии (после нерадикальной операции) позволила закончить курс без перерыва при удовлетворительных показателях иммунного статуса и кроветворения.

Показатели иммунного статуса были в пределах нижней границы нормы в течение всего периода лекарственной терапии. Это особенно важно, если учитывать, что в схемы лечения включались кортикостероиды. Пациенты, в течение длительного времени получавшие пептид (30 дней по 2 мг в сутки, затем 30 дней перерыв, далее снова 30 дней прием препарата), практически не болели вирусными инфекциями. Установлено, что пептид является иммуномодулятором, эффективность которого при онкологических заболеваниях не ниже таковой тималина и тактивина, которые были взяты в качестве препаратов сравнения. Препарат применяется перорально и не требует инъекционных манипуляций, что также положительно его характеризует. Оценивали следующие показатели: побочные реакции на препарат на фоне лучевой терапии, выраженность побочных реакций на лучевую терапию, характер местных мероприятий по снижению побочных реакций на облучение, длительность лечения, необходимость перерывов в лечении, обусловленных побочными реакциями,

---

---

изменения состава крови, их характер, длительность, сроки появления.

Полученные положительные результаты легли в основу второго этапа изучения эффективности пептидов в комплексном лечении последствий лучевой терапии. С этой целью 19 больных независимо от характера опухолевого процесса (это было предметом изучения на первом этапе), получающих лучевую терапию на области грудной и брюшной полости, принимали его по стандартной методике – 2 мг в сутки. Прием пептидов начинали за 1–2 дня до начала облучения.

У 19 пациентов, которым лучевая терапия проводилась на зоны выше и ниже диафрагмы (лимфогранулематоз), прием пептидов был постоянным. Длительность облучения составляла 4–5 нед. при суммарной дозе 40–45 Гр на одну зону.

Оценивались: иммунодепрессия, как правило 2-й или 3-й степени; сроки специфического противоопухолевого лечения препаратами, снижающими иммунную защиту; симптоматическая терапия для уменьшения проявления побочных эффектов лучевого и цитостатического воздействия.

Все больные получили не менее 4 курсов пептидов (2 мг ежедневно в течение 10 дней). Затем был перерыв 10 дней, и курс повторяли.

Таким образом, пептиды оказывали положительное действие в период подготовки к операции, к химио- и лучевой терапии, а также после этих экстремальных воздействий.

*Использование пептидного препарата  
для коррекции иммунных нарушений  
у онкогинекологических больных  
с послеоперационными осложнениями  
хирургических вмешательств*

Послеоперационные осложнения, их профилактика и лечение – одна из приоритетных задач современной онкологии. В структуре хирургической патологии гнойно-воспалительные заболевания и осложнения составляют около 35%. Инфекционные осложнения – причина послеоперационной летальности у половины умерших в хирургической клинике. Хирургический метод лечения является одним

---

---

из основных компонентов комплексных и комбинированных программ терапии больных со злокачественными новообразованиями – это практически около 70% всех пациентов. Частота осложнений при этом колеблется от 2 до 12% всех оперированных больных, что, с одной стороны, приводит к ухудшению течения основного заболевания, а с другой – удлиняет сроки последующих видов лечения опухоли, что в современной онкологии совершенно недопустимо.

В патогенезе развития гнойно-воспалительных осложнений хирургических вмешательств важная защитная роль принадлежит иммунной системе и неспецифической резистентности организма (Черноусов, Винницкий, 2012). Практически любая хирургическая операция оказывает неблагоприятный эффект на иммунную систему. При этом формируется вторичный или приобретенный иммунодефицит, главным проявлением которого являются инфекционные послеоперационные осложнения. Они вызываются условно-патогенными или оппортунистическими, чаще всего внеклеточными микроорганизмами – представителями нормальной микрофлоры организма или внутрибольничными штаммами и неадекватностью ответа защитной системы макроорганизма на бактериальную инвазию. Эти микроорганизмы, как правило, обладают атипичными биологическими свойствами и множественной антибиотикоустойчивостью. Они проявляют патогенность только при резком снижении иммунореактивности организма хозяина, что и имеет место при хирургическом вмешательстве. В настоящее время основными возбудителями гнойных хирургических инфекций считаются стафилококки, грамотрицательные бактерии семейства *Enterobacteriaceae* и так называемые неферментирующие бактерии. Существенную роль в этиологии раневой хирургической инфекции также играют облигатные неспорообразующие анаэробные бактерии.

Главная роль в борьбе с этими условно-патогенными микробами принадлежит факторам естественной резистентности: фагоцитозу, естественным антителам и исходной активности Т-клеточного звена иммунитета. Хирургическая операция вызывает снижение уровня всех основных компонентов иммунной системы – фагоцитоза, гуморального и клеточного иммунитета. Эти изменения во многом определяют условия для развития послеоперационных гнойно-воспалительных осложнений, а также сепсиса.

---

---

Таким образом, проблема гнойной хирургической инфекции остается актуальной, несмотря на постоянный поиск новых методов ее лечения и профилактики. Одним из важных направлений является коррекция иммунодефицитных состояний, закономерно сопровождающих гнойную инфекцию и отягощающих ее течение. Чаще всего в этих условиях требуется коррекция фагоцитоза. Учитывая значение фагоцитоза в захвате и уничтожении микроорганизмов, играющих роль в развитии гнойно-воспалительных осложнений, современная иммунология предлагает в комплексе лечения послеоперационных осложнений, а также для их профилактики использовать иммуностимулирующие препараты, усиливающие фагоцитарные процессы в организме.

На базе Приморского краевого онкологического диспансера проведены исследования эффективности препарата в комплексе лечения онкогинекологических больных с иммунологическими нарушениями и послеоперационными осложнениями хирургических вмешательств (Запорожец и др., 2004; Грицюк и др., 2004).

В онкогинекологии хирургические вмешательства – главный этап лечения у подавляющего большинства больных. Значительную часть здесь составляют расширенные вмешательства. Подобные операции сопровождаются массивным повреждением тканей, большой кровопотерей. Следствием этого являются послеоперационные осложнения. Частота осложнений зависит от ряда отягчающих факторов, в том числе от преморбидного фона: наличия злокачественного новообразования, ожирения, сахарного диабета, анемии средней и тяжелой степени, вынужденной длительной госпитализации до операции, предшествующей лучевой и цитостатической терапии и др. У большинства больных до операции имеет место развитие вторичной иммунологической недостаточности, усугубляющейся хирургическим вмешательством. Это диктует необходимость применения иммуностимулирующих веществ в комплексе профилактики и лечения осложнений у онкологических больных. К сожалению, на практике у большинства пациенток с онкологическими заболеваниями органов малого таза в комплексе лечебных мероприятий иммунокоррекция не проводится вообще. И хотя в последнее время иммунокорректирующие средства находят применение в клинической практике, следует признать, что внимание, уделяемое иммунной

---

---

реабилитации данных пациенток, как перед операцией, так и после нее явно недостаточно.

Особенностью иммунных нарушений у онкологических больных еще до оперативного вмешательства является нарушение функционирования всех звеньев иммунной системы, но преимущественно показателей клеточного иммунитета, затрагивающее Т-лимфоциты, НК-клетки, моноциты / макрофаги, а также другие клетки, необходимые для обеспечения эффективной противоопухолевой защиты. Показатели же гуморального иммунитета у большинства больных практически соответствуют норме даже на поздних стадиях развития опухоли (Черноусов, Винницкий, 2012). Отмечается низкая фагоцитарная активность нейтрофилов, увеличение активности Т-супрессоров, дисбаланс в системе цитокинов. Облучение и интенсивные схемы химиотерапии являются агрессивными методами терапии онкологических больных, вызывающими значительную иммунологическую недостаточность и, как следствие, снижение резистентности больных к инфекциям.

Пептидный препарат из нервной ткани кальмара оказался эффективным в предоперационной подготовке онкогинекологических больных. В этом случае для профилактики послеоперационных осложнений авторы настоящей монографии рекомендуют назначать его пациентам в течение 14 дней до операции по 1 мг два раза в день в утренние и вечерние часы независимо от приема пищи. Препарат хорошо переносится, нежелательных побочных эффектов при его использовании не отмечено. Эта БАД к пище не заменяет базовую антибактериальную симптоматическую терапию.

Эффективность препарата, который получали больные в комплексе средств предоперационной подготовки, иллюстрируется следующими результатами, полученными авторами данных исследований в клинике.

В обследование были включены 80 больных, находившихся на лечении в отделении онкогинекологии Краевого онкологического диспансера. Средний возраст больных  $56,3 \pm 1,6$  года. У всех был верифицирован рак гениталий (яичников и эндометрия I–III стадий). Общее состояние пациентов, определяемое по шкале Карновского (KRS), оценивалось как удовлетворительное (80%–KRS–100%), у двух больных – средней степени тяжести (60%–KRS). У всех боль-

---

---

ных на момент исследования имелись клинические, рентгенологические и лабораторные признаки прогрессирования заболевания. У 72 больных (90%) было выявлено наличие сопутствующей хронической патологии со стороны различных систем (сердечно-сосудистой, дыхательной, гепатобилиарной, почечной). Таким образом, по своему основному заболеванию, частоте выявления сопутствующей патологии, а также возрастному составу включенные в исследование больные относились к группе исходно иммунокомпromетированных пациентов.

Выбор средств базовой терапии определялся клиническими особенностями заболевания. Первым этапом программы терапии всех больных было оперативное лечение. Всех больных рандомизировали методом случайной выборки на однородные, сопоставимые по возрасту и клинической картине группы. У всех больных, получавших пептид в предоперационном периоде по вышеуказанной схеме (20 чел.), было отмечено заживление послеоперационной раны первичным натяжением в сроки до 10 дней. У 25% женщин (в контрольной группе было 20 женщин, получавших плацебо), не получавших пептид в комплексной послеоперационной подготовке, наблюдалось вторичное заживление раны в сроки до 14 дня.

Клинические и биохимические показатели крови у больных, получавших перед операцией пептидный препарат, достигали исходного уровня к 4–5-м суткам после операции, тогда как в контрольной группе (плацебо) – к 7–10-м суткам послеоперационного периода.

У этих двух групп больных (опытной и контрольной) прослежены изменения иммунного статуса после операции. Установлено, что у больных, получавших пептид в предоперационном периоде, в сравнении с больными контрольной группы после операции повышался процент CD3<sup>+</sup>-лимфоцитов с  $58,2 \pm 2,0\%$  до  $63,9 \pm 1,9\%$ ,  $p = 0,04$ . У больных контрольной группы процент CD3<sup>+</sup>-лимфоцитов, наоборот, снижался с  $55,9 \pm 2,2\%$  до  $52,4 \pm 1,8\%$ ,  $p = 0,02$ . Те же изменения претерпевали CD4<sup>+</sup>-лимфоциты (в опыте до операции  $32,7 \pm 2,0\%$ , после операции –  $38,8 \pm 2\%$ ,  $p = 0,04$ ; в контроле до операции  $33,7 \pm 1,2\%$ , после операции –  $29,5 \pm 1,1\%$ ,  $p = 0,01$ ). Обращают на себя внимание фагоцитарный показатель и фагоцитарное число нейтрофилов. В контрольной группе до операции ФП по отношению к золотистому стафилококку составил  $62,2 \pm 1,1\%$ , после операции –

---

---

$59,1 \pm 1,1\%$ ,  $p = 0,05$ . У больных, получавших до операции пептид, ФП повысился с  $61,6 \pm 2,2\%$  до  $68,9 \pm 2,2\%$ ,  $p = 0,02$ . Фагоцитарное число повысилось только у больных, получавших пептид в комплексе предоперационных мероприятий (до операции –  $3,0 \pm 0,2$ , после операции –  $4,1 \pm 0,1$ ,  $p = 0,02$ ).

Таким образом, использование пептидного препарата в комплексе предоперационной подготовки онкологических больных позволяет снизить число гнойно-воспалительных осложнений хирургического вмешательства, сократить срок заживления послеоперационной раны, а также сроки возвращения к нормальным значениям клинических и биохимических показателей крови.

Наиболее грозным осложнением оперативного вмешательства является нагноение послеоперационной раны, что приводит к дальнейшему ослаблению организма и возможному развитию сепсиса. В итоге это способствует длительному пребыванию больной в стационаре, что, в свою очередь, грозит присоединением внутрибольничной инфекции. При развитии осложнений в послеоперационном периоде (серомы, гематомы, расхождение краев раны, нагноение) целесообразно назначение пептида в двух формах (таблетированной и в виде геля). Пептиды в таблетках рекомендуется применять в комплексе лечения по 1 мг внутрь 2 раза в день в течение 14 дней с момента развития осложнения. Пептиды в составе геля показаны для местного применения. После обработки раны гель наносят из тюбика на всю ее поверхность. В недоступные места и дно раны гель подводится с помощью шприца. На рану следует наложить повязку с целью удаления избыточного экссудата.

У 46% больных с осложнениями послеоперационного периода, не получавших пептидов, наблюдали вторичное заживление раны, длительность госпитализации составляла  $27,8 \pm 3,1$  дней. Включение в комплексную терапию курса пептидов приводило к устойчивому клиническому эффекту: у 72% больных было отмечено заживление послеоперационной раны первичным натяжением, длительность госпитализации сокращалась до  $20,8 \pm 1,5$  дней,  $p = 0,04$ . У больных с развившимися послеоперационными осложнениями динамика параметров Т-клеточного звена иммунитета и фагоцитарной активности нейтрофилов характеризуется нарастающей депрессией. Включение в комплексную терапию больным с послеоперационными

---

---

ми осложнениями пептидов сопровождалось нормализацией иммунологических параметров:

CD<sup>3+</sup>-лимфоциты с  $55,4 \pm 1,4\%$  до  $64,7 \pm 1,2\%$  ( $p = 0,000$ );

CD<sup>4+</sup>-лимфоциты с  $32,8 \pm 1,7\%$  до  $38,2 \pm 0,9$  ( $p = 0,008$ );

CD<sup>8+</sup>-лимфоциты с  $23,5 \pm 1,1\%$  до  $26,2 \pm 0,8$  ( $p = 0,05$ );

CD<sup>16+</sup>-лимфоциты с  $12,4 \pm 1,1\%$  до  $16,9 \pm 1,2\%$  ( $p = 0,009$ );

ФП нейтрофилов с  $54,7 \pm 3,1$  до  $64,5 \pm 3,2\%$  ( $p = 0,03$ );

ФЧ нейтрофилов с  $2,6 \pm 0,02$  до  $4,0 \pm 0,4$  ( $p = 0,003$ ).

Собственный эффект пептидов, оцениваемый по формуле А. М. Земскова, составил для CD<sup>3+</sup>-лимфоцитов – 23% при профилактическом применении и 30% при использовании в комплексе лечения послеоперационных осложнений; CD<sup>8+</sup>-лимфоцитов – 5% и 25% соответственно; ФП нейтрофилов – 16% и 17% соответственно; ФЧ нейтрофилов – 22% и 58% соответственно.

Исследования позволили определить наиболее информативные иммунологические маркеры гнойно-воспалительных осложнений послеоперационных вмешательств у онкогинекологических больных: относительное содержание CD<sup>3+</sup>- и CD<sup>4+</sup>-лимфоцитов и ФП и ФЧ нейтрофилов крови.

Эти показатели дают возможность мониторировать течение и тяжесть этих заболеваний, прогнозировать развитие осложнений, а также оценивать эффективность иммунокоррекции в лечебных и профилактических мероприятиях.

Важную роль в процессе заживления операционной раны играют провоспалительные цитокины, в частности TNF $\alpha$ , нарушение продукции и рецепции которых приводит к глубоким дефектам антиинфекционной защиты и развитию послеоперационных осложнений. В то же время резкое увеличение секреции провоспалительных цитокинов или дисбаланс соотношения оппозиционных пулов могут приводить к реинфекции, присоединению нозокомиальных инфекций, формированию «молчащих» абдоминальных абсцессов, развитию иммуносупрессии вплоть до иммунологического паралича. В развитии послеоперационных осложнений имеет значение и подавление функции Th-1 (ИЛ-4) в предоперационном периоде. Практическое отсутствие сывороточного ИЛ-4 у больных со злокачественными опухолями связывают с истощением резервных возможностей клеток-продуцентов или переходом на качественно новый уровень

---

---

с другими механизмами саморегуляции с продукцией других цитокинов.

При исследовании цитокинового статуса у больных онкогинекологическими заболеваниями выявлены следующие закономерности: в предоперационном периоде содержание TNF $\alpha$  в сыворотке крови больных не превышало значений показателя у здоровых доноров, ИЛ4 и IFN $\gamma$  не выявлялись у 60–80% больных; в динамике послеоперационного периода у больных с негнойными осложнениями способность к продукции цитокинов сохранялась, при тяжелых гнойных осложнениях резко снижалась, TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$  и ИЛ-4 в сыворотке крови не определялись. Назначение таким больным пептида в комплексе мероприятий предоперационной подготовки приводит к увеличению содержания TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$  и ИЛ-4 в сыворотке крови в послеоперационном периоде; включение пептидов из нервной ткани кальмара в курс лечения больных с негнойными осложнениями (серома, гематома, гиперемия послеоперационных швов, культиты) сопровождается повышением продукции цитокинов.

При тяжелых послеоперационных осложнениях (разлитой перитонит, абсцесс, флегмона, осумкованный гнойник) включение пептидов в комплекс лечебных мероприятий не обеспечивало стимуляции продукции цитокинов. В этих случаях предпочтительнее заместительная цитокинотерапия либо стимуляция большей интенсивности, которая может достигаться использованием лекарственных форм иммуномодуляторов, вводимых парентерально, что не исключает применение препарата в комплексной предоперационной подготовке даже в случае развития осложнений, так как эта БАД способствует быстрому заживлению ран, сокращению сроков послеоперационного периода, снижению тяжести послеоперационных осложнений, а также сокращению сроков пребывания больного в стационаре.

К настоящему времени известны методы лечения послеоперационных инфекционных осложнений, сочетающие как общие, так и местные воздействия на организм при использовании одного препарата. Мы включили в программу лечения онкогинекологических больных оперативное вмешательство с последующим местным и системным использованием пептида и геля, имеющего в своем составе этот же пептид в сочетании хитозаном – полисахаридом, получаемым из панциря краба и обладающим высокой сорбцион-

---

---

ной способностью, ранозаживляющим действием, бактерицидной и противоопухолевой активностью (Володько, 2014). Соотношение компонентов в геле «Бальзам океана» (г/л): пептиды – 0,05–0,01; хитозан – 30–35; аскорбиновая кислота – 19–21; вода – остальное. Сочетание свойств компонентов, входящих в состав геля, обеспечивает его регенерирующее действие, усиление фагоцитарных процессов в ране, а также антибактериальный эффект. Гель имеет pH 5,9–6,0 (слабокислая среда), что вполне приемлемо для наружного применения.

Установлена эффективность применения геля, заключающаяся в уменьшении времени регенерации шва (в опытной группе – 8 сут, в контрольной – 16 сут). При нанесении геля на гнойную рану отмечено предотвращение развития дефектов апоневроза и эвентрации, более раннее по сравнению с контролем отторжение гнойно-некротических тканей, очищение раны и появление свежих грануляций.

Таким образом, применение пептидов из нервной ткани кальмара в двух его формах – БАД и геля для местного применения – способствует первичному заживлению раны, профилактике послеоперационных осложнений как в области раны, так и в области культи влагалища, сокращению сроков пребывания больных в стационаре, снижению интенсивности проявлений интоксикационного синдрома, нормализации иммунного статуса.

Все вышеперечисленное позволяет рекомендовать применение БАД на основе пептидов из нервной ткани кальмара в виде таблеток и геля как в период предоперационной подготовки, так и в случае возникновения послеоперационных осложнений хирургического вмешательства у онкогинекологических больных.

Гель с пептидами оказался эффективным у проктологических пациентов с послеоперационными осложнениями (Зинатулина, 2006). Работа проведена на базе отделения колоректальной хирургии Приморской краевой клинической больницы № 1 при участии авторов настоящей монографии. Под наблюдением находились 104 больных. Основную группу (52 чел.) составили больные, которые в послеоперационном периоде получали на область раны аппликации с гелем «хитозан+пептид».

У основной группы пациентов сокращение площади раневой поверхности происходило на 2–3 дня быстрее, чем в контрольной.

---

---

Если у больных основной группы осложнения отмечались в 30,8 % случаев, то у лиц контрольной группы – в 50 %. Больные основной группы находились в стационаре  $9,36 \pm 0,36$  дней, лица контрольной группы –  $11,7 \pm 0,32$  дней.

Эти данные позволили рекомендовать применение геля хитозанового с пептидами из нервной ткани кальмара для наружного применения в комплексе лечения ран у проктохирургических больных во все фазы раневого процесса.

*Применение пептидного препарата  
из нервной ткани кальмара в комплексном  
лечении дисбактериоза кишечника у детей  
с аллергодерматозами*

Дисбиоз кишечника (ДК) сопровождается многими заболеваниями у взрослых и детей. Патогенетической особенностью ДК часто является наличие иммунологической недостаточности с формированием сенсibilизации к различным пищевым, бытовым, грибковым и бактериальным (*E.coli*, *P.mirabilis*, *S.aureus*, *Candida albicans* и др.) аллергенам. Желудочно-кишечный тракт (ЖКТ) играет важную роль в формировании защиты от антигенов внешней среды. Большинство клеток организма находится в стерильном окружении и встречается с ограниченным количеством антигенов. Эпителий ЖКТ отделяет ткани макроорганизма от множества живых и неживых субстанций с признаками чужеродной генетической информации, при этом часть из них полезна, а часть вредна для организма. Это накладывает определенные ограничения на характер регулирования иммунных реакций в ЖКТ. В патогенезе хронизации заболеваний органов пищеварения важную роль играет аллергия организма, что в определенной мере связано с нарушением микроэкологии кишечника и снижением иммунологической защиты организма. По современным представлениям нарушение микробного пейзажа кишечника и изменение иммунного статуса следует рассматривать в единстве как факторы, взаимовлияющие друг на друга и на течение основного заболевания. На фоне угнетения колонизационной резистентности микрофлоры усугубляется клиника аллергических заболеваний, которые сопровождаются иммунологической недостаточностью вследствие иммуносупрессивного действия гистамина.

---

Аллергизация организма, как правило, сопровождается нарушением его резистентности к бактериальным агентам и способствует развитию дисбиоза, который, в свою очередь, создает благоприятный фон для развития сенсibilизации организма. Создается своего рода замкнутый круг. Кроме того, в результате жизнедеятельности нормальная грамотрицательная микрофлора кишечника постоянно вырабатывает эндотоксины. У здоровых лиц негативной реакции при этом не наблюдается благодаря специфическим и неспецифическим факторам защиты. В условиях патологии наступает прорыв защитных механизмов, что сказывается на клиническом течении аллергодерматоза.

Таким образом, наличие дисбиоза кишечника тесно связано с бактериальной сенсibilизацией и оказывает угнетающее действие на клеточные факторы иммунитета и фагоцитоз, что ведет к персистенции микробов в организме больного и развитию хронических, рецидивирующих форм аллергопатологии и увеличению частоты осложнений.

В процессе наблюдения за пациентами с атопическим дерматитом установлено, что выраженные качественные и количественные нарушения микробиоценоза кишечника, возникающие как вторичное состояние, играют значительную роль в патогенезе основного заболевания. Причиной развития дисбиоза у данных больных является наличие иммунодефицитного состояния и угнетающего действия на микрофлору кишечника антибиотиков пенициллинового ряда, применяемых ранее по поводу заболеваний верхних дыхательных путей. В связи с этим в комплекс лечения детей была включена иммуномодулирующая терапия. В качестве иммунокорректора использовали пептиды из нервной ткани кальмара, который применяли в виде БАД перорально, что является наиболее целесообразным при дисбиозе кишечника.

Под наблюдением находились 40 детей в возрасте от 1 до 12 лет, страдающих атопическим дерматитом (Стукун и др., 1999). Всех пациентов исследовали на количественный и видовой состав микрофлоры кишечника по общепринятой методике. Определяли содержание бифидо- и лактобактерий, бактероидов, кишечной палочки. В зависимости от содержания того или иного представителя микрофлоры делали заключение о степени выраженности дисбиоза.

---

У 47 % детей была выявлена 2-я степень, у 30 % – 3-я, у 23 % – 4-я степень. Среди всей облигатной флоры у всех больных наиболее выражен был дефицит нормально ферментирующей кишечной палочки с высевом условно-патогенной флоры (клебсиелла, протей) у части больных.

Второй анализ кала проводили через 24–30 дней. У всех больных в динамике исследовали иммунный статус. Показатели иммунной системы у всех обследованных детей отличались от возрастной нормы значительным снижением относительного и абсолютного количества основных субпопуляций лимфоцитов. В 68 % случаев отмечено снижение уровней сывороточного IgA, в 79 % – секреторного IgA слюны, в 10 % – снижение уровня IgG, в 15 % – снижение уровня IgM. Фагоцитарная активность нейтрофилов была снижена у 83 % пациентов. У большинства детей наблюдали значительный дефицит лакто- и бифидобактерий, степень дисбиоза коррелировала со степенью иммунологической недостаточности и тяжестью клинических симптомов аллергодерматоза. Наличие этой корреляции еще раз подтвердило тесную связь между состоянием микробиоценоза кишечника и иммунной системой и целесообразность применения иммуномодуляторов в комплексной терапии дисбиоза кишечника.

Длительность курса и частота приема препарата зависели от степени тяжести дисбиоза, в среднем применяемая доза составила 0,05 мг на 1 кг массы тела 2 раза в день в течение 10 дней. В процессе терапии не было отмечено побочных эффектов, аллергических реакций и усугубления клинических симптомов основного заболевания.

При включении БАД к пище на основе пептидов в комплекс терапевтических мероприятий у пациентов (по сравнению с группой контроля, не получавшей БАД) было отмечено более быстрое (уже на 4–5-й день) купирование дисфункции кишечника: наступала нормализация стула, улучшались аппетит и моторика кишечника, быстрее купировались симптомы основного заболевания. После комплексной терапии дисбактериоза кишечника с применением БАД у пациентов с атопическим дерматитом отмечена элиминация эшерихий с гемолизующими свойствами и слабо выраженными ферментативными

свойствами, устранение избытка энтерококков, уменьшение дефицита бифидобактерий.

При динамическом наблюдении показателей иммунного статуса отмечалась тенденция к нормализации относительных и абсолютных показателей клеточного и гуморального звена, увеличение сывороточного и секреторного IgA, выравнивание дисбаланса иммунорегуляторных клеток и восстановление их функциональной активности (Табл. 23). Наиболее позитивные изменения иммунного статуса при терапии препаратом отмечались со стороны функциональной активности моноцитарно-макрофагального звена, что нашло отражение в нормализации показателей НСТ-теста.

Таким образом, полученные данные позволяют установить, что включение в комплексную терапию дисбактериоза кишечника иммуномодулятора природного происхождения у больных с аллергодер-

Таблица 23

**Влияние БАД к пище на основе пептидов из нервной ткани кальмаров на показатели иммунного статуса детей с аллергодерматозами (Стукун и др., 1999)**

Показатель	Норма	До лечения (n = 25)	После лечения (n = 25)
CD3+	64 ± 3,5	41,4 ± 4,1	64,1 ± 2,8
CD20+	24 ± 2,8	11,0 ± 2,9	15,8 ± 2,3
CD4+	37 ± 2,7	29,3 ± 3,7	38,6 ± 2,4
CD8+	29 ± 3,4	19,2 ± 2,4	28,5 ± 2,0
CD16+	11 ± 4,1	10,3 ± 2,6	12,6 ± 2,5
CD4+/CD8+	1,3 ± 0,29	1,5 ± 0,2	1,35 ± 0,17
Дети 6–12 лет			
		n = 15	n = 15
CD3+	70 ± 4,5	59 ± 3,2	67,8 ± 2,4
CD20+	16 ± 2,3	18,9 ± 1,9	17,3 ± 1,7
CD4+	37 ± 2,4	34,7 ± 2,7	38,6 ± 2,5
CD8+	28 ± 1,6	26,7 ± 1,9	27,5 ± 2,0
CD16+	13 ± 1,9	10,2 ± 1,8	13,1 ± 2,5
CD4+/CD8+	1,3 ± 0,2	1,3 ± 0,2	1,4 ± 0,17

матозами обеспечивает более быстрый регресс кожных проявлений и купирование клинических симптомов болезни. Происходит улучшение анаэробного и аэробного компонентов кишечного микробиоценоза, коррекция факторов местного иммунитета, нормализация структуры и функции слизистой оболочки кишечного тракта. При использовании БАД на основе пептидов из нервной ткани кальмара усиливается иммунобиологическая реактивность организма и устойчивость к инфекционным, токсическим, медикаментозным и другим дисбиотическим воздействиям.

Вышеперечисленные данные и полученный положительный эффект при включении препарата в комплекс терапевтических мероприятий по лечению аллергодерматозов у пациентов с признаками нарушения микробного пейзажа кишечника позволяют рекомендовать его в качестве иммунокорректирующей БАД для этой категории пациентов.

*Применение пептидного препарата из нервной ткани кальмара для коррекции нарушений в системе гемостаза у больных с бронхообструктивным синдромом*

Применение иммунокорректоров, в том числе полипептидной природы, в пульмонологии патогенетически обоснованно в связи с развитием вторичной иммунологической недостаточности и подтверждено большим клиническим опытом. Целью работы было изучение влияния препарата на показатели системы гемостаза у больных с хронической обструктивной болезнью легких (ХОБЛ, бронхиальной астмой (БА)). Как известно, одним из ключевых звеньев патогенеза этих заболеваний является система гемостаза. Патология этой системы проявляется внутрисосудистым свертыванием крови по типу латентного ДВС-синдрома, приводящего к значительным нарушениям микроциркуляции, легочной гипертензии, формированию хронического легочного сердца, требующим специфического лечения с помощью препаратов, улучшающих реологические свойства крови (антикоагулянтов, антиагрегантов).

Обследовано 60 больных с ХОБЛ и 91 больной атонической БА средней степени тяжести и тяжелым течением заболевания (Кузнецова, 2009). По каждой болезни выделяли контрольную группу



больных, получавших базисный курс лечения: ингаляционные симпатомиметики, холинолитики, кортикостероиды и, по необходимости, антибиотики, а также группу пациентов, получавших помимо основной терапии БАД на основе пептидов из нервной ткани кальмара, который назначали по 1 мг в сутки однократно больным с заболеванием средней степени тяжести или двукратно при тяжелой степени заболевания в течение 10–15 дней.

Всем пациентам проводилось исследование функционального состояния системы гемостаза при поступлении в стационар и при выписке. Для сравнительного анализа полученных результатов обследовали группу практически здоровых лиц в возрасте от 20 до 60 лет (среднее значение нормы). В комплексе обследования оценивали следующие параметры коагулограммы: тромбиновое время (ТВ), протромбиновый индекс (ЛГИ), фенантролиновый тест (ФТ), уровни фибриногена (ФГ) и антитромбина Ш (АТ-Ш), фибринолитическая активность крови (ФА). Для оценки влияния препарата на систему гемостаза учитывались больные ХОБ и БА с повышенными значениями фенантролинового теста и сниженными показателями фибринолитической активности. Группу больных ХОБЛ, получавших базисный курс лечения, составили 16 чел., курс лечения с применением препарата – 13, при БА – 18 и 38 чел., соответственно.

У больных ХОБЛ и БА при поступлении в клинику выявлены изменения в системе гемостаза по типу латентного ДВС-синдрома (Табл. 24, 25). Так, до лечения у этих больных показатели ФТ, являющегося наиболее информативным и стандартизованным показателем системы гемокоагуляции, выявляющим циркуляцию в крови активного тромбина и растворимых фибрин-мономерных комплексов, значительно превышали таковые у здоровых людей. Такие показатели системы гемостаза, как ТВ, ПТИ, ФГ, были в пределах нормы, несколько повышен уровень АТ-Ш (показатель состояния противосвертывающей системы крови). ФА была снижена в среднем вдвое по сравнению со значением нормы, что является прогностически неблагоприятным признаком для больных, так как способствует отложению избытка фибрина, являющегося матрицей для фибробластов, и ведет к формированию фиброза.

Сравнительный анализ исходных показателей ФТ, АТ-Ш и ФА у больных БА и ХОБ показал у последних более выраженные нару-

Таблица 24

Показатели системы гемостаза у больных хроническим обструктивным бронхитом на фоне приема пептидов из нервной ткани кальмаров

Показатель системы гемостаза	Больные, не получавшие пептиды (контроль)		Больные, получавшие пептиды		Среднее значение и границы нормы
	Поступление	Выписка	Поступление	Выписка	
Тромбиновое время, с	17,06 ± 0,52	17,19 ± 0,61	16,85 ± 0,44	16,9 ± 0,49	16,0 ± 1,8 14–17
Протромбиновый индекс, %	101,0 ± 1,64	100,2 ± 1,21	97,1 ± 2,28	99,7 ± 1,61	100,0 ± 5,4 90–105
Фенантролиновый тест, мг %	17,5 ± 2,31*	16,7 ± 2,31*	21,4 ± 2,51**	14,4 ± 2,15*	3,38 ± 0,39 2–4
Фибриноген, г/л	3,47 ± 0,25	3,49 ± 0,15	3,25 ± 0,25	3,11 ± 0,17	3,10 ± 0,67 2–4
Антитромбин Ш, %	108,0 ± 4,34	112,9 ± 3,28	120,2 ± 3,80**	107,0 ± 4,01	101,0 ± 7,2 85–115
Фибринолитическая активность	6,81 ± 0,66*	8,79 ± 0,96*	6,98 ± 0,51**	10,69 ± 1,60	14,0 ± 2,1 11–19

\*  $p < 0,05$  – достоверность различий по отношению к среднему значению нормы.

\*\*  $p < 0,05$  – достоверность различий при сравнении показателей при поступлении и при выписке.

Показатели системы гемостаза у больных бронхиальной астмой на фоне приема пептидов из нервной ткани кальмаров

Показатель системы гемостаза	Больные, не получавшие пептиды (контроль)		Больные, получавшие пептиды		Среднее значение и границы нормы
	Поступление	Выписка	Поступление	Выписка	
Тромбиновое время, с	17,08 ± 0,62	17,92 ± 0,53	16,06 ± 0,47	16,04 ± 1,54	16,0 ± 1,8
Протромбиновый индекс, %	99,3 ± 2,77	100,0 ± 1,87	101,0 ± 2,13	98,6 ± 1,59	100,0 ± 5,4
Фенантролиновый тест, мг%	15,62 ± 2,64*	15,20 ± 2,71*	12,94 ± 1,75*	7,96 ± 1,34**	3,38 ± 0,39
Фибриноген, г/л	3,38 ± 0,29	3,25 ± 0,25	3,15 ± 0,16	3,02 ± 0,15	3,10 ± 0,67
Антитромбин III, %	107,3 ± 4,34	112,7 ± 3,67	113,0 ± 3,42	112,4 ± 3,47	101,0 ± 7,2
Фибринолитическая активность, %	7,69 ± 0,59*	8,39 ± 1,19*	7,53 ± 0,38*	11,6 ± 0,95**	14,0 ± 2,1

\*  $p < 0,05$  – достоверность различий по отношению к среднему значению нормы.

\*\*  $p < 0,05$  – достоверность различий при сравнении показателей.

шения гемостаза, что может объясняться необратимостью бронхиальной обструкции. Так, при ХОБ значения ФТ были статически достоверно выше таковых при БА и отличались от средненормальных в 5,1–6,3 раза, а у больных БА – лишь в 3,8–4,6 раза.

В процессе лечения как в опытной, так и в контрольной группах больных получена положительная динамика таких показателей гемостаза, как ФТ и ФА. Однако у больных, получавших комплекс лечения с применением БАД, эти изменения были выражены в большей степени. Так, у последних значения ФТ снижались с  $21,4 \pm 2,51$  мг% при поступлении до  $14,3 \pm 2,16$  мг% при выписке, а у больных, не принимавших БАД, снижение ФТ было незначительным. Фибринолитическая активность, напротив, возростала по окончании лечения, и это возрастание статистически достоверно отличалось от изначальных показателей у больных, принимавших пептид ( $6,98 \pm 0,51$  % при поступлении и  $10,69 \pm 1,60$  % при выписке), но не было достоверным в контрольной группе ( $6,81 \pm 0,66$  % при поступлении и  $8,79 \pm 0,96$  % при выписке).

В отношении больных БА по параметрам ФТ и ФА выявлены аналогичные результаты, свидетельствующие о положительном влиянии БАД на основе пептидов из нервной ткани кальмара на показатели свертывающей и противосвертывающей систем крови (Табл. 24).

Полученные данные показали, что в результате лечения ХОБ и БА с применением пептидов наблюдалось статистически достоверное снижение ФТ и нарастание ФА, тогда как у больных соответствующих контрольных групп эти изменения не являлись достоверно значимыми. Это свидетельствует о том, что пептид приводит к снижению интенсивности ДВС-синдрома и увеличению фибринолитического потенциала крови, что, в свою очередь, способствует предотвращению процессов фиброобразования в бронхиальном дереве. Однако полной нормализации этих показателей не происходит, что, по-видимому, можно объяснить непродолжительным сроком наблюдения больных в стационаре.

Таким образом, включение БАД на основе пептидов из нервной ткани кальмара в лечебный комплекс больных ХОБ и БА оказывает положительное влияние на систему гемостаза, купируя явления внутрисосудистого свертывания крови и повышая ее фибринолити-

---

---

ческий потенциал. Исходя из этого и учитывая иммуномодулирующие свойства этой БАД к пище, можно рекомендовать включение ее в курс терапии больных хроническими обструктивными заболеваниями дыхательных путей.

*Пептидный препарат из нервной ткани кальмара в комплексном лечении пневмонии у лиц с алкогольной и наркотической зависимостью*

В настоящее время доказано, что пневмония развивается на фоне иммунодефицита разной степени выраженности и требует комплексного терапевтического подхода с включением иммуностропных средств. Как известно, у пациентов с отягощенным анамнезом (наркомания, алкоголизм, курение) течение острого заболевания сопровождается угнетением фагоцитарных, медиаторных и секреторных функций нейтрофилов. В литературе это явление называется феноменом «лейкоцитарной депрессии». При этом какой бы возбудитель ни обусловил пневмонию, он обязательно вызовет нарушение функций полиморфноядерных лейкоцитов. Наибольшая депрессия этих клеток наблюдается в случаях, когда этиологическим фактором воспаления являются стрептококки, синегнойная палочка, ассоциации бактерий. Свой вклад в подавление фагоцитоза вносит медикаментозная терапия, в частности антибиотики. В основе этого действия лежит как прямое повреждение фагоцитирующих клеток, так и подавление активности костномозгового кроветворения. Подобным образом влияют на фагоцитирующие клетки курение, алкоголь и наркотики. Для стимуляции фагоцитарной активности полиморфноядерных лейкоцитов в комплексе лечения 120 больных пневмонией с отягощенным анамнезом (алкоголизм, курение, наркомания) был применен препарат пептидов (Мымрикова, 2003). Больные получали его ежедневно по 1 мг/сут внутрь в утренние часы в течение 10 дней.

Как показали исследования, прием БАД к пище на основе пептидов из нервной ткани кальмара обуславливал повышение фагоцитарной активности лейкоцитов у больных пневмонией с отягощенным анамнезом. Так, у больных с легким течением болезни через 10 дней от начала лечения с включением в курс пептидов ФП составил  $83,1 \pm 1,2\%$  (в контроле  $70,6 \pm 1,2\%$ ), ФЧ  $5,6 \pm 0,7\%$  (в контроле

$4,4 \pm 0,8\%$ ). У больных со средне тяжелым течением заболевания эти показатели составили соответственно  $72,5 \pm 3,1\%$  (в контроле  $61,2 \pm 3,8\%$ ) и  $5,5 \pm 0,8\%$  (в контроле  $2,8 \pm 0,2\%$ ). У больных с тяжелым течением пневмонии ФП был равен  $54,8 \pm 3,4\%$  (в контроле  $40,2 \pm 2,9\%$ ), ФЧ  $4,9 \pm 0,3\%$  (в контроле  $2,6 \pm 0,2\%$ ). Как следует из этих данных, в большей степени стимулируется захват микроорганизмов (ФЧ – среднее число микробов, поглощенных одной клеткой), а не число участвующих в фагоцитозе лейкоцитов.

Таким образом, больным пневмонией с отягощенным анамнезом по наркомании, алкоголизму и курению следует включать в курс терапии иммунокорректоры, в частности БАД к пище на основе пептидов из нервной ткани кальмара – доступный и недорогой биопрепарат, полученный из природных источников.

*Применение БАД на основе пептидного препарата из нервной ткани кальмара в комплексном лечении псориаза*

В условиях бальнеологического отделения БАД к пище на основе пептида в комплексе с препаратом эйкозопентаеновой кислоты (ЭПК) применен для лечения больных с диагнозом «псориаз». Первая (контрольная) группа состояла из 10 больных, лечение которых проводилось с помощью родоновых ванн, препарата ЭПК в виде мази 2 раза в день и лазеротерапии в течение 24 дней. Во вторую группу (2-й контроль) вошли также 10 больных, лечение которых проводилось общепринятым методом с помощью родоновых ванн источника «Чистоводное». Третью группу составили 10 чел., которые получали лечение как больные 1-й контрольной группы. Кроме того, в комплекс лечения этих больных вошел пептид (в виде БАД к пище) по 1 мг 2 раза в сутки в течение 12 дней.

Установлено, что включение в комплекс лечения пептидов из нервной ткани кальмара значительно (на 7–8 дней по сравнению с больными контрольных групп) ускоряет разрешение процесса.

*Применение БАД на основе пептидного препарата из нервной ткани кальмара в офтальмологии*

При таких глазных болезнях, как глаукома, увеиты, травмы глаза, наблюдаются изменения в иммунном статусе больного. В клинике

---

глазных болезней препарат применяли при лечении глубокого кератита герпетической этиологии и рецидивирующего увеита токсико-аллергической природы. Исследования проведены в Тихоокеанском государственном медицинском университете под руководством д.м.н. профессора В. Я. Мельникова (Мельников и др., 2003). Длительное лечение этих болезней традиционными методами не давало положительных результатов. После подключения к схеме лечения курса исследуемого пептида (в виде БАД к пище) происходило значительное улучшение состояния больных.

У больных с диагнозом «кератит» острота зрения увеличилась с 0,01–0,02 до 0,08–0,1, уменьшились инфильтрация роговицы и явления раздражения глаз. У больных с диагнозом «рецидивирующий увеит» прекратились боли в глазу, исчезла инъеция глазного яблока, расширился зрачок. Уменьшился экссудат в стекловидном теле. Острота зрения повысилась с 0,1–0,2 до 0,4–0,6. Всего БАД получали 23 пациента в возрасте от 40 до 53 лет. По-видимому, его лечебный эффект, наиболее выраженный в начальном проявлении заболеваний, связан с высоким содержанием в нем таурина (сульфоаминокислоты), выпускаемого в нашей стране как терапевтическое средство в офтальмологии под названием «Тауфон».

#### *Применение БАД на основе пептидного препарата из нервной ткани кальмара в комплексном лечении пациентов с инфекционным эндокардитом*

В настоящее время инфекционный эндокардит (ИЭ) является серьезной медико-социальной проблемой. Это связано в первую очередь с ростом заболеваемости ИЭ, увеличением удельного веса первичных форм болезни, изменением клинической картины с возрастанием числа атипичных вариантов, появлением новых форм ИЭ, тяжелыми осложнениями, полиэтиологичностью ИЭ, а также серьезным прогнозом и высоким числом летальных исходов при этой патологии. В патогенезе ИЭ ключевое значение имеют нарушения функционального состояния иммунной системы. Установлено, что при септическом варианте ИЭ показано применение иммуномодуляторов.

Исследования эффективности препарата были проведены у 14 больных ИЭ (1-я группа). Контрольная (2-я) группа была пред-

---

ставлена больными ИЭ, получавшими базисную терапию антибиотиками в зависимости от чувствительности флоры. Среди больных 1-й группы было 5 чел. с первичным (ПИЭ) и 8 с вторичным инфекционным эндокардитом (ВИЭ), из них 4 мужчины и 9 женщин в возрасте от 22 до 56 лет. Во 2-й группе было 7 больных ПИЭ и 9 ВИЭ, из них 10 мужчин и 6 женщин в возрасте от 19 до 61 года. Исследование иммунного статуса проводили при поступлении в стационар и перед выпиской. Пациенты получали пептиды в виде таблеток курсом 3 нед. по 1 мг 1 раз в сутки.

Исследование иммунного статуса больных 1-й и 2-й групп, проведенное с помощью метода моноклональных антител, позволило установить, что в 1-й группе отмечено достоверное повышение уровня CD3, CD20 (ВИЭ).

Установлено достоверное снижение уровня циркулирующих иммунных комплексов до нормальных показателей у больных 1-й группы по окончании терапии (1-я группа: при поступлении  $73,9 \pm 5,7\%$ ; при выписке  $36,29 \pm 4,80\%$ ; 2-я группа: при поступлении  $112,2 \pm 12,39\%$ , при выписке  $89,38 \pm 6,19\%$ ).

При исследовании изменений фагоцитарной активности нейтрофилов под влиянием БАД на основе пептидов у больных 1-й группы обнаружено достоверное повышение этого показателя (1-я группа: при поступлении  $66,2 \pm 4,46\%$ , при выписке –  $73,8 \pm 1,93\%$ ; 2-я группа: при поступлении  $66,6 \pm 3,7\%$ ; при выписке –  $66,8 \pm 2,2\%$ ).

Таким образом, установлено, что у больных ИЭ, получавших только антибактериальную терапию по поводу основного заболевания, к моменту выписки из стационара не выявлено достоверных изменений со стороны показателей лимфоцитов, Т-клеточного и гуморального звеньев иммунитета, а также факторов неспецифической резистентности. В группе больных, получавших на фоне стандартной терапии пептиды из нервной ткани кальмара, установлена нормализация числа лейкоцитов, относительного и абсолютного числа лимфоцитов, абсолютного числа зрелых Т-лимфоцитов, циркулирующих комплексов, повышение фагоцитарной активности нейтрофилов. На основании этих данных препарат рекомендуется к применению в комплексе лечения в качестве иммунокорректора при первичном и вторичном инфекционном эндокардите (Васильева, 2003).

---

*Влияние БАД на основе пептидного препарата из нервной ткани кальмара на показатели центральной и периферической гемодинамики у практически здоровых лиц, выполняющих работу с психоэмоциональными перегрузками*

Под наблюдением находились 20 практически здоровых лиц в возрасте от 26 до 45 лет, выполняющих работу с психо-эмоциональными перегрузками (Гуляков и др., 2004).

Исследование центральной гемодинамики (ЦГ) проводили на реографе РГ-02 с оценкой ударного объема (УО), минутного объема крови (МОК) и общего периферического сопротивления сосудов (ОПСС). Применяли также реовазографию сосудов нижних конечностей (РВГ) и реоэнцефалографию (РЭГ). Все показатели анализировали до начала и через 10 дней приема пептида, назначаемого по 1 мг 3 раза в день.

Анализ результатов показал увеличение значений исходно сниженных по отношению к нормальным величинам показателей ЦГ и снижение исходно повышенных, более выраженных показателей ЦГ у пациентов с гипокинетическим типом гемодинамики. У лиц с эу- и гипокинетическим вариантами кровообращения МОК увеличивался к 10-му дню приема препарата соответственно на 10,0% и 17,2%. Ударный объем возрос с исходно сниженного уровня  $54,7 \pm 1,1$  до  $66,0 \pm 0,3$  мл/мин, ОПСС снизилось с исходно повышенного уровня  $3651,9 \pm 34,2$  до  $2815 \pm 31,04$  дин/хсм/с при гипокинетическом типе гемодинамики.

У лиц с гиперкинетическим типом показатели ЦГ имели тенденцию к сдвигам существующих отклонений, сохраняясь на уровне нормальных величин. При анализе показателей РВГ и РЭГ выявлено повышение амплитуды реографических волн, что свидетельствовало об интенсификации пульсового кровотока в сосудах нижних конечностей и сосудах мозга. Параллельно с гемодинамическими изменениями отмечалось повышение толерантности к рабочим нагрузкам, увеличение активности и работоспособности.

Таким образом, пептид из нервной ткани кальмара оказывает модулирующее влияние на нарушенные механизмы регуляции гемодинамики, воздействуя непосредственно на надсегментарные не-

---

специфические структуры мозга и опосредованно через улучшение кровообращения. Положительная динамика корковых функций, вероятно, объясняется его антистрессорным действием.

*Применение БАД на основе пептидного препарата из нервной ткани кальмара при хронических вирусных гепатитах на фоне наркотической зависимости*

Под наблюдением находились 40 больных, употребляющих наркотики с хронической НВС- и НСV-инфекцией в стадии репликации вируса (Филонова, 2012). Больным со среднетяжелым течением инфекционного процесса проводили обычную базисную терапию с дополнительным назначением 20 больным пептидов из нервной ткани кальмара в дозе 1 мг/сут 1 раз в сутки курсом 10 дней. 20 человек составили контрольную группу. Как показали наблюдения, чувство слабости исчезало у больных основной группы на 4-й день ( $4 \pm 0,4$ ) в контрольной – на 8-й день лечения ( $8,8 \pm 0,5$ ); тошнота, соответственно, на 3-й ( $3,5 \pm 0,2$ ) и 7-й дни, боли в животе – на 2-й ( $2,8 \pm 0,4$ ) и 6-й ( $6,7 \pm 0,5$ ) дни. Желтуха уменьшалась на 6-й ( $6,4 \pm 0,4$ ) и 10-й ( $10,1 \pm 0,5$ ), печень – на 6-й ( $6,8 \pm 0,4$ ) и 12-й ( $12,5 \pm 0,7$ ) дни терапии. В период лечения препаратом улучшения не отмечено только у 2 человек, в контрольной группе в те же сроки – у 7. Темпы снижения билирубина, аланинаминотрансферазы, щелочной фосфатазы были достоверно выше, чем в контрольной группе. На основании полученных результатов было предложено использовать пептиды (в виде БАД к пище) в комплексе лечения больных вирусными гепатитами с хроническими поражениями печени.

*Применение БАД на основе пептидного препарата из нервной ткани кальмара при псевдотуберкулезе*

Заболеваемость псевдотуберкулезом на Дальнем Востоке и в других регионах России стабильно остается на высоком уровне. Псевдотуберкулез имеет много клинических форм, сопровождается развитием рецидивов и осложнений. При этой болезни развивается вторичное иммунодефицитное состояние, требующее коррекции. Нами установлено, что патоморфоз экспериментальной псевдотуберкулезной инфекции у мышей и морских свинок при применении

препарата проявляется в виде уменьшения количества скоплений бактерий в органах, снижения интенсивности ДВС-синдрома, а также стимуляции макрофагальной реакции с резорбцией клеточного детрита в очагах воспаления (Беседнова, Сомова, 2006).

В сочетании с этиотропной терапией антибиотиками препарат значительно уменьшает выраженность некротического компонента патологического процесса у животных, а также явлений вторичного иммунодефицита с формированием тканевого иммунитета в органах.

Так как гибель возбудителя псевдотуберкулеза происходит в ПМЯЛ и макрофагах, то при купировании инфекционного компонента вторичного иммунодефицита следует назначать препарат больным одновременно с антибиотиками. Полученные результаты позволили рекомендовать применение пептидов из нервной ткани кальмара в комплексном лечении псевдотуберкулеза с целью предотвращения рецидивов, сокращения сроков лечения и нахождения больного в стационаре.

В настоящее время БАД к пище на основе пептидов из нервной ткани кальмара в комплексном лечении псевдотуберкулеза применяется в инфекционных стационарах Приморского края (Пушкарева и др., 2004). Пептиды, действующие на фагоцитарное звено иммунитета, можно назначать больным как с выявленными, так и с невыявленными нарушениями иммунного статуса, т.е. основанием его назначения является клиническая картина болезни.

#### *Применение БАД на основе пептидного препарата из нервной ткани кальмара при гонорее*

Традиционно в лечении хронических уретритов (эндоцервицитов) гонорейной природы кроме этиотропной терапии (антибиотиков) используется местное лечение в виде инстилляций в уретру, влагалищных ванночек, микроклизм (растворы протаргола 2%, колларгола 2%). Время процедуры – 10–15 мин, количество процедур – 10–15. Растворы колларгола или протаргола в ряде случаев вызывают аллергические реакции, неприятные ощущения (чувство жжения) в уретре, способствуют развитию кандидоза. Данные растворы обладают антибактериальным действием. В то же время особенностью гонореи является то, что возбудитель поражает слизистую мочепо-

ловых путей, поэтому состояние факторов местной защиты слизистой уrogenитального тракта, и в первую очередь фагоцитоз, играет большую роль в развитии и исходе инфекционного процесса.

С целью повышения эффективности лечения хронической гонореи на фоне иммунотерапии гоновакциной и антибиотикотерапии использовали в комплексе лечения пептид из нервной ткани кальмара, который обладает стимулирующим действием на поглотительную и переваривающую активность полиморфноядерных лейкоцитов и макрофагов по отношению как к грамположительным, так и грамотрицательным микроорганизмам. В связи с этим включение его в комплекс лечения гонореи представляется целесообразным (Сингур, Туркутюкова, 2003).

Для применения таблетку, содержащую 1 мг пептидов, растворяли в дистиллированной воде 1 : 10 при температуре 24–28°C. Более холодный или более горячий раствор вызывает неприятные ощущения у больных, и применение таких растворов чревато серьезными последствиями в виде воспалительных заболеваний или ожогов слизистых оболочек мочеполовых органов. Местное лечение проводили ежедневно в течение 10–15 дней, время процедуры – 10–15 мин. Одновременно больные получали гоновакцину и антибиотики.

Было пролечено 37 чел. с последующим проведением контроля излеченности. В группу вошли больные гонореей мужчины (27) и женщины (10) с хроническим течением процесса, ранее безуспешно леченные по этому поводу другими методами (Табл. 26).

Мужчины получали инстилляцию в уретру, женщины – инстилляцию в уретру, влагалищные ванночки и микроклизмы. Пациенты отмечали хорошую переносимость процедуры. Побочных эффектов и осложнений не выявлено. Анализ результатов исследования показал, что на фоне проведенной терапии у всех больных наступило выздоровление. На 6–7-й день лечения исчезали выделения из уре-

Таблица 26

#### Лечение гонореи с последующим проведением контроля излеченности

Пол	Всего	Рецидивы заболевания	Неудачи лечения
Мужчины	27	6 (22%)	21 (78%)
Женщины	10	3 (30%)	7 (70%)

тры, дискомфорт в уретре проходил на 8–9-й день. Проведенные контроли излеченности (1-й через 10 дней, 2-й через 1 мес после окончания лечения) неудач лечения и рецидивов заболевания не выявили (Табл. 27).

Таблица 27

**Результаты использования препарата  
в комплексном лечении гонореи, %**

Показатель	Традиционное лечение		Лечение с применением препарата	
	1-й контроль излеченности	2-й контроль излеченности	1-й контроль излеченности	2-й контроль излеченности
Неудачи лечения	28	63	-	-
Рецидивы заболевания	-	9	-	-
Излеченность, %	72	28	100	100

*Примечание.* Прочерк – не определено.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о высокой эффективности использования пептидов из нервной ткани кальмара для местного лечения гонореи. Включение раствора этого пептида в план комплексного лечения гонореи значительно повышает терапевтический эффект и дает возможность добиться полного излечения.

*Применение БАД на основе пептидного препарата из нервной ткани кальмара при герпетической инфекции*

Рецидивирующая герпесвирусная инфекция характеризуется острыми воспалительными проявлениями, разнообразием клинической картины, а также торпидностью к стандартной противовирусной терапии.

Лечение хронических, часто рецидивирующих форм HSV-инфекции до настоящего времени представляет определенные трудности. Прежде всего это объясняется следующими биологическими особенностями герпесвирусов: все герпесвирусы являются внутриклеточными паразитами; герпесвирусы пожизненно персистируют

в оксоноганглиальных структурах центральной и периферической нервной системы; в течение жизни человек многократно реинфицируется новыми штаммами герпесвирусов, при этом возможно одновременное сосуществование нескольких типов вирусов; при нарушении динамического равновесия между иммунным гомеостазом и вирусами последние переходят в активную форму.

Проведено клинико-иммунологическое обследование и лечение 300 больных с герпетической инфекцией в фазе активных клинических проявлений (Суховой и др., 1999). Клиническое и лабораторное обследование назначали перед началом лечения и через 2–3 дня после его окончания. У всех больных проводили клинический и биохимический анализ крови, а также исследование иммунного статуса с определением субпопуляционного состава лимфоцитов, иммуноглобулинов сыворотки крови и фагоцитарной активности лейкоцитов.

Анализ результатов клинического обследования больных показал значительно большую эффективность сочетанного лечения (пептиды из нервной ткани кальмара, зовиракс, интерферон), чем эффективность лечения зовираксом и индукторами интерферона. У 94% больных отмечено сокращение срока купирования воспалительных явлений и наступления эпителизации. При назначении пептидов 1 мг/сут болевой синдром исчезает на 3–4 дня раньше, чем при традиционном лечении. При оценке лабораторных данных отмечено повышение показателя фагоцитоза полиморфноядерных лейкоцитов с  $40 \pm 0,5\%$  в контроле до  $61 \pm 1,5\%$  в опыте.

Таким образом, пептиды из нервной ткани кальмара может быть хорошим и эффективным дополнением при лечении герпетической инфекции. Он безвреден, хорошо переносится больными, что позволяет широко применять его в клинической практике.

Применение БАД на основе пептидного препарата из нервной ткани кальмара при хронических уретритах у мужчин. При хроническом уретрите часто регистрируется дисфункция общего и, особенно, местного иммунитета, что требует соответствующей коррекции (Юцковская, 2007). При хронической хламидийной и уреоплазменной инфекциях с преобладанием клеточного типа паразитирования наиболее целесообразно применение иммуномодуляторов с преимущественным воздействием на фагоцитарное звено (нейтрофилы

и макрофаги). Пептиды из нервной ткани кальмаров является одним из таких препаратов. Его высокая клинико-иммунологическая эффективность при хроническом гонорейном уретрите послужила основанием для проведения исследований у больных хроническим бактериальным уретритом. Препарат использовали в комплексной терапии с азитромицином. Пептиды применяли по 1 мг 3 раза в день в течение 10 дней. Такая комбинированная схема была назначена 13 больным с хроническим уреоплазменным уретритом, 13 – с хламидийным уретритом и 14 – с хроническим уретритом микст хламидийно-уреоплазменной этиологии.

Анализ клинико-иммунологической эффективности комбинированной терапии был проведен с использованием метода А. М. Земскова (1997) в соответствии с расчетом собственного эффекта иммуномодулятора. Динамика клинических проявлений у больных с хроническим уреоплазменным уретритом, получавших пептиды, оказалась более благоприятной. У всех больных было зарегистрировано исчезновение клинических проявлений болезни. В группах с хроническим хламидийным и микст-уретритом полный клинический эффект установлен в 76,92% (10 чел.) и 64,29% (9 чел.) соответственно. Слабый эффект выявлен только у 2 больных (14,29%) с микст-инфекцией (Табл. 28).

При оценке бактериологической эффективности иммунотропной терапии с включением в схему лечения пептидов из нервной ткани кальмара было установлено, что удельный вес выявления *U. urealyticum* в диагностическом титре существенно уменьшился (выявлен у 1 больного – 7,69%), тогда как частота выявления антигена хламидий при микст-инфекции не изменилась, а при моно-хламидийном уретрите стала ниже (23,08%).

При хроническом уреоплазменном и хламидийном уретрите важным является уменьшение частоты рецидивов. При оценке частоты развития осложнения также была выявлена положительная динамика. Частота осложнений при уреоплазменном уретрите снизилась в 1,6 раза; при хламидийном и микст-формах хронического уретрита – в 1,4 и 1,3 раза соответственно.

Оценку динамики иммунных показателей через 1 мес после традиционной и комбинированной с препаратом терапии проводили, принимая следующие условные оценки: 1 балл – улучшение пока-

Таблица 28

Сравнение клинико-лабораторной эффективности в баллах традиционной терапии азитромицином и комплексной терапии с препаратом

Группы мужчин с хроническим уретритом	n	Азитромицин				Препарат			
		Клинический эффект	Бактериологическая эффективность <i>U. urealyticum</i>	Бактериологическая эффективность <i>C. trachomatis</i>	Общая сумма	Клинический эффект	Бактериологическая эффективность <i>U. urealyticum</i>	Бактериологическая эффективность <i>C. trachomatis</i>	Общая сумма
		%	балл	%	балл	%	балл	%	балл
<i>U. urealyticum</i>	11	81,82	1,0	81,82	1,0	-	-	-	2
<i>C. trachomatis</i>	10	70,0	0,5	60	0,5	-	-	76,92	1,5
<i>U. urealyticum</i> + <i>C. trachomatis</i>	10	60,0	0,5	70	0,5	-	-	64,29	1,5



---

---

зателя у 75–100% больных, 0,5 балла – соответственно у 50–74%, 0 балла – 0–49%.

Общая балльная оценка комплексной терапии с препаратом была максимальной при лечении хронического уреоплазменного уретрита и составила 6,5 баллов против 5,0 баллов, при хроническом уретрите – 4,5 балла против 3,0 баллов, при микст-уретритах – 3,5 балла против 2,0 баллов. Это позволяет рекомендовать пептиды из нервной ткани кальмара в комплексные программы терапии больных с хроническими уретритами.

### *Стратегия применения пептидов из нервной ткани гидробионтов*

Основной сферой применения пептидов являются вторичные иммунодефицитные состояния, при которых инфекционные агенты играют существенную роль в развитии заболевания. Как правило, для лечения этих иммунодефицитов применяются антибактериальные, противогрибковые и противовирусные препараты. В конечном итоге гибель большинства как внеклеточных, так и внутриклеточных микробов происходит в фагоцитарных клетках – нейтрофилах и макрофагах. Наиболее целесообразно при лечении инфекционного компонента иммунодефицита назначать препарат одновременно с антибиотиками. При комплексном применении антибиотика и препарата по возбудителю наносится двойной удар: антибиотик существенно подавляет функциональную активность возбудителя и делает его более чувствительным к киллерному эффекту фагоцита, а препарат существенно стимулирует функциональную активность фагоцита, повышая его способность поглощать и убивать возбудителя. Аналогичная ситуация имеет место и при вирусной инфекции: пептид, повышая цитотоксические свойства макрофагов и  $T$ -клеток, значительно усиливает их способность убивать вирусинфицированные клетки – главный путь диссеминации возбудителя в организме. Помимо антибиотиков пептиды из нервной ткани кальмара хорошо взаимодействуют и с препаратами интерферонового ряда и их индукторами. Нанесение тройного удара по возбудителю – противовирусное средство, пептид и индуктор интерферона – является исключительно эффективным, например, при хронической герпетической

---

---

инфекции. Такой же эффект будет, по-видимому, наблюдаться при цитомегаловирусной инфекции.

При иммунореабилитационных мероприятиях пептиды может применяться в виде монотерапии в комплексе с различными общеукрепляющими средствами. Это оправдано у людей с неполным выздоровлением (наличие бронхита, ларингита, трахеита и др.), у часто и длительно болеющих людей, перед началом осенне-зимнего сезона, особенно в экологически неблагоприятных регионах, у онкологических больных для улучшения качества жизни.

Пептиды из нервной ткани кальмара, действующие на фагоцитарное звено иммунитета, можно назначать больным как с выявленными, так и с невыявленными нарушениями иммунного статуса, т.е. основанием для его назначения является клиника заболевания. При наличии в лечебно-профилактическом учреждении соответствующей материально-технической базы применение пептидов целесообразно проводить на фоне иммунологического мониторинга, который следует осуществлять вне зависимости от выявления исходных изменений в иммунной системе.

Подводя итог вышесказанному, можно считать, что использование пептидов из нервной ткани кальмаров в комплексе с другими лекарственными средствами поможет врачам-иммунологам более эффективно лечить больных с признаками вторичного иммунодефицита.

## Литература

Авилов С.А., Калинин В.И., Сильченко А.С. и др. Метод получения фрондозиды и методы стимуляции иммунной системы млекопитающих. Патент РФ № 2339644. 27.06.2008.

Алексеева Л.И., Цветкова Е.С. Остеоартроз: из прошлого в будущее // Научно-практическая ревматология. 2009. № 2. Прилож. С. 31–37.

Артюков А.А. Разработка биотехнологических основ получения некоторых биологически активных веществ из океанического сырья: автореф. дис. ... д-ра биол. наук / Тихоокеанский ин-т биоорганич. химии ДВО РАН. Владивосток, 2012. 48 с.

Бадюкин В.В. Значение воспаления в развитии и течении остеоартроза // Consilium medicus. 2009. № 11 (9). С. 91–95.

Беседнова Н.Н., Касьяненко Ю.И., Эпштейн Л.М., Гажва А.К. Иммунотропные свойства дезоксирибонуклеиновой кислоты из молок лососевых рыб // Антибиотики и химиотерапия. 1999. № 10. С. 13–15.

Беседнова Н.Н., Эпштейн Л.М. Иммуноактивные пептиды из гидробионтов и наземных животных. Владивосток: ТИНРО-Центр, 2004. 240 с.

Беседнова Н.Н., Эпштейн Л.М. Природный модификатор функций врожденного иммунитета. ДНК из молок дальневосточных лососей. Владивосток: Медицина ДВ, 2010. 188 с.

Беседнова Н.Н., Сомова Л.М. Патоморфоз псевдотуберкулезной инфекции на фоне применения тинростима // Тихоокеан. мед. журн. 2006. № 4. С. 43–47.

Блинов Ю.Г., Боровская Г.А., Акулин В.Н., Эпштейн Л.М. Пищевая биологически активная добавка «Тинростим-С». Патент РФ № 2105504. 1998.

Бочаров Л.Н., Боровская Г.А., Блинов Ю.Г., Ковалев Н.Н., Пивненко Т.Н., Эпштейн Л.М. Способ получения иммуностимулятора. Патент РФ № 2222337. 2003.

Боровская Г.А., Эпштейн Л.М., Беседнова Н.Н., и др. Новый лечебно-профилактический продукт с иммуномодулирующей добавкой // Вопросы питания. 1996. Т. 4. С. 28–30.

Боровская Г.А., Ковалев Н.Н., Эпштейн Л.М. Сравнительная характеристика аминокислотного состава пептидов нервной ткани // Изв. ТИНРО. 1999. Т. 125. С. 172–175.

Вайнберг Ю.П., Каплина Э.М., Кольцов П.А. и др. Получение высокополимерной ДНК из молок осетровых рыб // Хим. – фарм. журн. 1982. № 7. С. 67–70.

Васильева М.М. Клинико-иммунологические особенности современного течения инфекционного эндокардита: автореф. дис. ... канд. мед. наук. Хабаровск, 2003. 22 с.

Верткин А.Л., Алексеева Л.И., Наумов А.В. и др. Остеоартроз в практике врача-терапевта // РМЖ. 2008. Т. 16. № 7. С. 478–480.

Володько А.В. Полиэлектролитные комплексы хитозан-каррагинан: дис. ... канд. хим. наук. Владивосток, 2014. 137 с.

Гажва А.К. Иммуноактивный пептид из оптических ганглиев кальмара. Автореф. дис. ... канд. мед. наук. Владивосток, 1994. 23 с.

Голубев Г., Кригштейн О. Оценка доказательств эффективности средств, претендующих называться структурно-модифицирующими препаратами // Междунар. журн. медицинской практики. 2005. № 2. С. 38–52.

Гуляков М.Б., Ковалев Н.Н., Пивненко Т.Н., Позднякова Ю.М., Эпштейн Л.М. Сравнительное исследование влияния БАД из морских гидробионтов на физическую работоспособность // Изв. ТИНРО. 2004. Т. 136. С. 315–320.

Грицук Т.А., Запорожец Т.С., Н.Н. Беседнова и др. Биологически активная добавка Тинростим в профилактике и комплексном лечении послеоперационных осложнений в онкогинекологии // Методические рекомендации, утвержденные начальником департамента здравоохранения Администрации Приморского края. Владивосток, 2004.

Гурина Л.И. Роль морепродуктов в энтеральном питании при хирургическом лечении заболеваний желудка: автореф. дис. ... канд. мед. наук. Владивосток, 1990. 22 с.

Давидович В.В. Биотехнология биологически активной добавки к пище «Моллюскам»: дис. ... канд. техн. наук. Владивосток, 2006. 166 с.

Давидович В.В., Пивненко Т.Н. Аминокислоты двусторчатых моллюсков: биологическая роль и применение в качестве БАД // Изв. ТИНРО. 2001. Т. 129. С. 146–153.

Давидович В.В., Пивненко Т.Н., Аюшин Н.Б., Юрьева М.И. Оценка антиоксидантного действия БАД к пище «Моллюскам» // Изв. ТИНРО. 2006. Т. 145. С. 338–347.

Данилевская Н.В., Николаев А.А. Хондропротекторы и их использование в ветеринарии // Ветеринар. 2002. № 3. С. 45–49.

Дроздова О.А., Авилов С.А., Калиновский А.И. и др. Трисульфатированные гликозиды из голотурии *Cuscutaria japonica* II // Химия природ. соедин. 1996. № 3. С. 369–374.

Ефимова С.Н., Савватеева Л.Ю. Экономическая эффективность использования для подкормки норок отходов кальмара и кукумарии: Информ. лист № 87–81. Приморский ЦНТИ. Владивосток, 1981. 4 с.

Запорожец Т.С., Эпштейн Л.М. и др. Опыт применения Тинростима – пептида из нервной ткани кальмара – для лечения гнойных ран // Материалы VIII Междунар. конф. «Здоровье семьи – XXI век». Гоа, Индия, 2004. С. 68–70.

Запорожец Т.С. Клеточные и молекулярные механизмы иммуномодулирующего действия биополимеров морских гидробионтов: дис. ... докт. мед. наук. Владивосток, 2006. 365 с.

*Зборовский А.Б., Мозговая Е.Э.* Алфлутоп: опыт многолетнего клинического применения // Фарматека. 2006. № 19. С. 1–5.

*Земсков А.М., Земсков В.М., Золоедов В.И., Белозовский Е.* Специфическая и неспецифическая иммунокоррекция // Успехи соврем. биологии. 1997. Т. 117, вып. 3. С. 261–268.

*Зинатулина А.М.* Влияние биополимеров из морских гидробионтов на течение раневого процесса в колоректальной хирургии (клинико-экспериментальное исследование) : автореф. дис. ... канд. мед. наук. Владивосток, 2006. 23 с.

*Исачкова Л.М., Тимченко Н.Ф., Сомов Г.П.* // Архив. 1984. № 5. С. 69–74.

*Каплина Э.Н.* Некоторые итоги клинического применения препарата «Деринат» с 1976 по 2000 г. // Материалы Первой Всерос. конф. «Использование препарата «Деринат» в различных областях медицины». М., 2000. 47 с.

*Каплина Э.Н., Вайнберг Ю.П.* «Деринат» – природный иммуномодулятор для детей и взрослых. М., 2007. 154 с.

*Каредина В.С., Зенкина В.Г., Солодкова О.А.* Морфология яичников неполовозрелых крыс при кормлении пищевыми добавками «Тингол-1» и «Тингол-2» // Успехи соврем. естествознания. 2003. № 11. 53 с.

*Касьяненко Ю.И., Пивненко Т.Н.* Сравнительные физико-химические характеристики низкомолекулярной ДНК из морских гидробионтов // Изв. ТИНРО. 1999. Т. 125. С. 152–158.

*Кишов М.Г., Грабовский В.С.* Функциональная характеристика лейкоцитов при старении человека // Иммунология. 1996. № 4. С. 4–6.

*Клычкова Г.Ю., Пивненко Т.Н.* Ингибиторная активность хрящевой ткани акул и ее изменение под действием ферментативного гидролиза // Изв. ТИНРО. 2001. Т. 129. С. 74–81.

*Крылова Н.В.* Клеточные и молекулярные механизмы противовирусной защиты при клещевом энцефалите: автореф. дис. ... д-ра мед. наук. Москва, 2014. 47 с.

*Куваева З.И., Лопатин Д.В., Маркович М.М. и др.* Синтез L-орнитина L-аспартата из L-аргинина // Химико-фармацевтический журнал. 2012. Т. 46. № 8. С. 30–32.

*Кузнецова Т.А.* Коррекция нарушений иммунитета и гемостаза биополимерами из морских гидробионтов (экспериментальные и клинические аспекты): дис. ... д-ра мед. наук. Москва, 2009. 316 с.

*Кузнецова Т.А., Ковалев Н.Н., Беседнова Н.Н. и др.* Оценка эффективности гелей, содержащих биологически активные вещества из морских гидробионтов на модели термического ожога // Здоровье. Медицинская экология. Наука. 2014. № 3 (57). С. 36–37.

*Кузнецова Т.А., Беседнова Н.Н., Ковалев Н.Н., Запорожец Т.С., Плехова Н.Г., Сомова Л.М., Зубрицкий В.Ф., Земляной А.Б.* Способ приготовления

геля для лечения ран и ожогов. Патент РФ № 2545893. Зарегистрировано в Госреестре изобретений РФ 26 февраля 2015 г.

*Ланкин В.З., Тихазе А.К., Беленков Ю.Н.* Свободнорадикальные процессы в норме и при патологических состояниях. М.: РКНПК МЗ РФ, 2001. 78 с.

*Лихобабин В.Я., Запорожец Т.С., Беседнова Н.Н. и др.* Использование ганглиина в комплексной терапии больных меланомой // Тез. докл. III Национ. конгр. «Человек и лекарство». М., 1996. С. 156–157.

*Мельников В.Я., Мирошниченко О.В., Пивненко Т.Н., Мельникова Н.В.* Применение природного антиоксиданта «Моллюскам» в комплексном лечении больных первичной открытоугольной глаукомой // Клинич. офтальмология. 2003. Т. 4, № 3. С. 107–108.

*Мельников В.И., Пивненко Т.Н.* Влияние нутрицевтиков морского происхождения на показатели клинического анализа крови и ее цитокинового профиля у спортсменов в период интенсивных физических нагрузок // Materials of the X International scientific and practical conference «Prospects of world science» on Pedagogical sciences. Physical culture and sport. Sheffield, EK, 2014. Vol. 5. P. 103–107.

*Михеев Е.В.* Комплексная технология биологически активной добавки к пище «Тинростим» и препарата холинэстеразы из ганглиев кальмара: дис. ... канд. техн. наук. Владивосток, 2009. 123 с.

*Мыррикова, Е.Г.* Пневмония у лиц с факторами риска: клинико-иммунологические особенности и возможности иммунокорригирующей терапии: автореф. дис. ... канд. мед. наук. Владивосток, 2003. 25 с.

*Новиков В.Е., Новикова А.В.* Биогенные стимуляторы метаболических процессов хрящевой ткани // Экспериментальная и клиническая фармакология. 2011. Т. 74, № 4. С. 31–35

*Павлинич С.Н.* Экспериментальное обоснование применения низкомолекулярной ДНК из молок лососевых рыб и напитков на натуральной основе с низкомолекулярной ДНК при псевдотуберкулезе: автореф. дис. ... канд. мед. наук. Владивосток, 2006. 25 с.

*Пешехонова Л.К., Пешехонов Д.В., Пилипенко В.В.* Назначение хондропротекторов в реальной клинической практике // РМЖ. 2009. № 17 (21). С. 1486–1490.

*Пивненко Т.Н., Суховерхова Г.Ю., Эпштейн Л.М. и др.* Экспериментально-морфологическое исследование лечебного действия препарата из хрящевой ткани акулы на модели инфекционно-аллергического артрита // Антибиотики и химиотерапия. 2005. № 50 (5/60). С. 20–23.

*Пивненко Т.Н., Суховерхова Г.Ю., Ковалев Н.Н., Суховерхов С.В.* Исследование состава свободных дисахаридов ферментативных гидролизатов из хрящевой ткани гидробионтов с помощью капиллярного электрофореза // Изв. ТИНРО. 2010. Т. 161. С. 309–317.

Пивненко Т.Н., Ковалев Н.Н. Панкреатические протеиназы морских организмов. Владивосток: Дальрыбвтуз, 2015. 600 с.

Пислягин Е.А., Юрченко Е.А., Горпенченко Т.Ю. и др. Взаимодействия тритерпенового гликозида кукумариозида А<sub>2</sub>-2 с мембранными рецепторами макрофагов мыши // Междунар. журн. прикладных и фундаментальных исследований. 2014. № 12. С. 119–124.

Позднякова Ю.М., Пивненко Т.Н., Касьяненко Ю.И. Влияние эндогенных ферментов на состав олигонуклеотидов при их выделении из гонад гидробионтов // Прикладная биохимия и микробиология. 2003. Т. 39, № 5. С. 524–529.

Позднякова Ю.М., Пивненко Т.Н., Эпштейн Л.М. Активность протеолитических и нуклеолитических ферментов в гонадах гидробионтов // Украинский биохим. журн. 2004. Т. 76, № 3. С. 49–53.

Попов А.М., Кривошапко О.Н., Артюков А.А., Козловская Э.П. Биомедицинские свойства пептидов из морских организмов и перспективы их использования // Исследования природных соединений в Тихоокеанском институте биоорганической химии им. Г.Б. Елякова. Владивосток: Дальнаука, 2013. С. 139–145.

Потапова В.В., Иванушко Л.А., Беседнова Н.Н., Орловская И.А., Пивненко Т.Н., Позднякова Ю.М. и др. Влияние БАД из тканей и органов морских гидробионтов на кроветворение при острой лучевой болезни // Изв. ТИНРО. 2004. Т. 139. С. 418–425.

Потапова В.В. Иммуномодулирующие и радиозащитные свойства биологически активных веществ из морских гидробионтов: дис. ... канд. мед. наук. Владивосток, 2005. 151 с.

Пушкарева Т.В. Экспериментальное обоснование клинического применения тинростима при псевдотуберкулезной инфекции : автореф. дис. ... канд. мед. наук. Владивосток, 2004. 23 с.

Рахманов Р.С., Кузнецова Л.В., Блинова Т.В. и др. Экологозависимая витаминно-минеральная недостаточность организма // Гигиена и санитария. 2014. № 2. С. 70–73.

Романенко В.А., Ковалев Н.Н., Еникеева Н.А., Эпштейн Л.М. Влияние биологически активной пищевой добавки из морских гидробионтов на холинэстеразную активность и перекисное окисление липидов сыворотки крови человека // Вопросы питания. 2000. № 5. С. 17–19.

Рыкова Е.Ю., Лактионов П.П., Власов В.В. Активирующее влияние ДНК на иммунную систему // Успехи соврем. биологии. 2001. Т. 121, № 2. С. 160–171.

Сахаров И.Ю., Литвин Ф.Е. Субстратная специфичность коллагенолитических протеиназ из гепатопанкреаса камчатского краба // Биохимия. 1992. Т. 57, № 1. С. 61–67.

Саяпина И.Ю., Целуйко С.С. Окислительный стресс в предстательной железе на этапах адаптации организма к низким температурам // Сибирский медицинский журнал. 2011. Т. 106, № 7. С. 31–34.

Сингур О.А., Туркутюкова Г.И. Местное применение тинростима при хронической гонорее // Тихоокеанский медицинский журнал. 2003. № 4. С. 55–57.

Слуцкая Т.Н. Сравнительная характеристика сушеных трепанга и кукумари // Исследования по технологии рыбных продуктов. 1972. Вып. 3. С. 139–146.

Слуцкий Л.И. Биохимия нормальной и патологически измененной соединительной ткани // Л.: Медицина, 1969. 377 с.

Слуцкий Л.И. Современные представления о коллагеновых компонентах хрящевой ткани: обзор // Вопр. мед. химии. 1985. Т. 31. С. 10–17.

Соловьева Н.И. Матриксные металлопротеиназы: регуляция активности и роль в процессе онкогенеза // Вопр. мед. химии. 2000. № 5. С. 30–31.

Солодкова О.А., Зенкина В.Г., Каредина В.С. Влияние экстракта кукумари японской на структуру надпочечников белых крыс при холодовом стрессе // Фундаментальные исследования. 2012. № 8. С. 419–423.

Софьина З.П. Модели и методы, применяемые для отбора противоопухолевых препаратов в СССР и за рубежом // Вопр. онкологии. 1976. Т. 22, № 4. С. 82–96.

Сахаров И.Ю., Литвин Ф.Е., Митькевич О.В. Гидролиз белков коллагенолитическими протеиназами камчатского краба // Биоорганич. химия. 1994. Т. 20, № 2. С. 190–195.

Степаненко Н.В. Влияние адаптогенов на гамма-интерферонгенез в условиях его ингибирования ксенобиотиками : автореф. дис. ... канд. мед. наук. Владивосток, 2004. 20 с.

Стоник В.А., Авиллов С.А., Калинин В.И. Биологически активные вещества из голотурий (морских кубышек) // Успехи в изучении природных соединений. Владивосток: Дальнаука, 1999. С. 105–123.

Стоник В.А., Аминин Д.Л., Богусавский В.М. и др. Иммуномодулирующее средство «Кумазид» и фармацевтическая композиция на его основе. Патент РФ № 2271820. 2006.

Стоник В.А. Морские природные соединения. Путь к новым лекарственным препаратам // Acta Naturae. 2009. Т. 1 (2). С. 16–27.

Стукун Е.А., Беседнова Н.Н., Цыпкина Г.И., Кольцов И.П. Использование пищевой добавки «Тинростим» в комплексной терапии дисбактериоза кишечника у детей с аллергодерматозами // Тихоокеан. мед. журн. 1999. № 3. С. 67–68.

Суховой В.Н., Гажа А.К., Боровская Г.А. и др. Применение тинростима в комплексном лечении герпетической инфекции // Тихоокеан. мед. журн. 1999. № 3. 92 с.

Суховерхова Г.Ю. Биохимическая характеристика хрящевой ткани гидробионтов и технология БАД к пище : автореф. дис. ... канд. техн. наук. Владивосток, 2006. 22 с.

Татаркина Н.Д., Жилкова Н.Н., Пивненко Т.Н., Фюшин Н.Б. Влияние Моллюскама на процессы кроветворения // Изв. ТИПРО. 2001. Т. 129. С. 68–73.

Тимчишина Г.Н. Обоснование технологий получения пищевых добавок из кукумарии (*Cucumaria japonica*) на основе комплексного использования сырья: автореф. дис. ... канд. техн. наук. Владивосток, 1999. 24 с.

Турна А.А. Матриксные металлопротеиназы в развитии деструктивных процессов при ревматоидном артрите // Науч.-практ. ревматология. 2010. № 3. С. 59–64.

Турпаев Т.М., Абашкина Л.И., Бресткин А.П. и др. Холинэстераза зрительных ганглиев кальмара *Ommastrephes sloanipacificus* // Физиология и биохимия беспозвоночных. Л.: Наука, 1968. С. 121–130.

Тутельян В.А., Суханов Б.П. Современные подходы к обеспечению качества и безопасности биологически активных добавок к пище в Российской Федерации // Тихоокеан. мед. журн. 2009. № 1. С. 12–19.

Федянина Л.Н. иммуномодулирующая активность низкомолекулярной дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) из молок лососевых рыб (фундаментальные и прикладные аспекты): дис. ... д-ра мед. наук. Владивосток, 2007. 307 с.

Ходырев А.П. Влияние нуклеиновых кислот на исход острой стрептококковой инфекции // Журн. эпидемиологии, микробиологии и иммунобиологии. 1974. № 10. С. 70–74.

Черноусов Ф.А., Винницкий Л.И. Профилактика послеоперационных осложнений с применением галавита: мета-анализ исследований // Consilium medicum. Хирургия. 2012. № 2. С. 25–31.

Шутикова А.Л., Запорожец Т.С., Пивненко Т.Н. и др. Антиоксидантная активность БАВ «Моллюскам» в экспериментах *in vitro* // Материалы II Регион. науч. конф. «Исследования в области физико-химической биологии и биотехнологии». Владивосток: ТИБОХ ДВО РАН, 2006а. 138 с.

Шутикова А.Л., Запорожец Т.С., Эпштейн Л.М. Влияние БАД «Моллюскам» на показатели клеточного и гуморального иммунитета у лиц пожилого возраста // Дальневост. мед. журн. 2006. № 3. С. 48–50.

Шутикова А.Л. Иммуномодулирующие и антиоксидантные свойства биологически активных веществ из морских гидробионтов и их использование в гериатрической практике: автореф. дис. ... канд. мед. наук. Владивосток, 2009. 24 с.

Эпштейн Л.М., Хавинсон В.Х., Сидорова Н.Д. и др. Способ получения иммуностимулятора: А.с. № 1103392. 1982.

Юцковская Я.А. Характеристика иммунного и цитокинового статуса мужчин с хроническим уретритом хламидийной и уреаплазменной этиологии: дис. ... канд. мед. наук. Владивосток, 2007. 147 с.

Якушин С.В., Усов В.В., Полежаев А.А., Болохова И.Л. Влияние топического применения иммуномодулятора и антиоксиданта на течение раневого процесса // Современ. проблемы науки и образования. 2012. № 6. С. 16–21.

Ярилин А.А. Возрастные изменения тимуса и Т-лимфоцитов // Иммунология. 2003. № 2. С. 117–128.

Ярилин А.А. Иммунология. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2010. 752 с.

Alsarra I.A. Chitosan topical gel formulation in the management of burn wounds // Int. Journ. of Biological Macromolecules. 2009. Vol. 45. P. 16–21.

Althunibat O. Y., Ridzwan B. H., Taher M., Jamaludin M. D., Ikeda M. A., Zali B. I. *In vitro* antioxidant and antiproliferative activities of three Malaysian sea cucumber species // Eur. J. Sci. Res. 2009. Vol. 37. P. 376–387.

Aminin D. L., Chaykina E. L., Agafonova I. G. et al. Antitumor activity of the immunomodulatory lead Cumaside // Int. Immunopharmacol. 2010a. Vol. 10. P. 648–654.

Aminin D. L., Silchenko A. S., Avilov S. A. et al. Immunomodulatory action of monosulfated triterpene glycosides from the sea cucumber *Cucumaria okhotensis*: stimulation of activity of mouse peritoneal macrophages // Natural Product Communications. 2010b. Vol. 5 (12). P. 1877–1880.

Aminin D. L., Zaporozhets T. S., Adryjashchenko P. V. et al. Radioprotective properties of cumaside, a complex of triterpene glycosides from the sea cucumber *Cucumaria japonica* and cholesterol // Nat. Prod Commun. 2011. Vol. 6 (5). P. 587–592.

Aminin D. L., Menchinskaya E. S., Pislgiagin E. A. et al. Anticancer activity of sea cucumber triterpene glycosides // Mar. Drugs. 2015. Vol. 13 (3). P. 1202–1223.

Andaloussi E. A., Sonabend A. M., Han Y., Lesniak M. S. Stimulation of TLR9 with CpG ODN enhances apoptosis of glioma and prolongs the survival of mice with experimental brain tumors // Glia. 2006. Vol. 56, № 6. P. 526–535.

Attoub S., Kholoud A., Al Sultan M. A. et al. Frondoside A suppressive effects on lung cancer survival, tumor growth, angiogenesis, invasion and metastasis // PLOS ONE. 2013. Vol. 8 (1). e 53087.

Bana G., Jamard B., Verrouil E. et al. Chondroitin sulfate in the management of hip and knee OA: an overview // Adv. Pharmacol. 2006. Vol. 53. P. 507–522.

Bordbar S., Anwar F., Saari N. High-Value Components and Bioactives from Sea Cucumbers for Functional Foods – A Review // Mar. Drugs. 2011. Vol. 9. P. 1761–1805.

Cale V., Freysdottir J., Paulsen B. S. et al. Sulfated polysaccharide from the sea cucumber *Cucumaria frondosa* affect maturation of human dendritic cells and their activation of allogeneic CD4+ T cells *in vitro* // Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre. 2013. Vol. 2. P. 108–117.

Chen J. Overview of sea cucumber farming and sea ranching practices in China // SPC Beche-de-mer Inf. Bull. 2003. Vol. 18. P. 18–23.

Choi J. H., Kim K. T., Kim S. M. Biofunctional Properties of Enzymatic Squid Meat Hydrolysate // Prev Nutr. Food Sci. 2015. Vol. 3. P. 67–72.

---

Collin P.D. Peptides having anti-cancer and anti-inflammatory activity. United State Patent 6,767,890. 27 July 2004.

Fox B.A., Stephens M.M. Glucosamine hydrochloride for the treatment of osteoarthritis symptoms // *Clin. Interv. Aging*. 2007. Vol. 2 (4). P. 599–604.

Girija S., Vijayshree P., Pandi S.K. *et al.* Isolation and characterization of lolduvin-S: a novel antimicrobial protein from the ink of Indian squid *Loligo duvauceli* // *Int J. of Current Res. and Review*. 2011. Vol. 3 (7). P. 4–14.

G mez-Guill n MC., L pez-Caballero ME., Alem n A., L pez de Lacey A., Gim nez B. and Montero P. Antioxidant and antimicrobial peptide fractions from squid and tuna skin gelatin. *Sea By-Products as Real Material: New Ways of Application*. 2010. Vol. 89. P. 90–115.

Hamaguchi P., Geirsdottir M., Vrac A., Kristinsson H.G., Sveinsdottir H., Fridjonsson O.H., Hreggvidsson G.O. *In vitro* antioxidant and antihypertensive properties of Icelandic sea cucumber (*Cucumaria frondosa*). Presented at IFT 10 Annual Meeting & Food Expo, Chicago, IL, USA, 17–20 July 2010. Presentation no. 282–304.

Hing H.L., Kaswandi M.A., Azraul-Mumtazah R., Hamidah S.A., Sahalan A.Z., Normalawati S., Samsudin M.W., Ridzwan B.H. Effect of methanol extracts from sea cucumbers *Holothuria edulis* and *Stichopus chloronotus* on *Candida albicans* // *Microsc. Microanal.* 2007. Vol. 13, P. 270–271.

Imanari T., Toida T., Koshiishi I., Toyoda H. High-performance liquid chromatographic analysis of glycosaminoglycan-derived oligosaccharides // *Journ. Chromatogr. A*. 1996. Vol. 720. P. 275–293.

Janakiram N.B., Mohammed A., Rao C.V. Sea cucumbers metabolites as potent anti-cancer agents // *Mar. Drugs*. 2015. Vol. 13 (5). P. 2909–2923.

Jordan K.M., Arden N.K., Doherty M. *et al.* EULAR Recommendations 2003: an evidence based approach to the management of knee osteoarthritis: Report of a Task Force of the Standing Committee for International Clinical Studies Including Therapeutic Trials (ESCISIT) // *Ann Rheum Dis*. 2003. Vol. 62. P. 1145–1155.

Kang K.Y., Ahn D.H., Wikinson G.T., Chun B.S. Extraction of lipids and cholesterol from squid oil with supercritical carbon dioxide // *Korean J. Chem. Eng.* 2005. Vol. 22 (3). P. 399–405.

Kapoor S.S. Dolastatin 15 and its emerging antineoplastic effects // *Eur. J. Cancer Prevention*. 2013. Vol. 22 (5). P. 486–487.

Karamanos N.K., Axelsson S., Vanky P., Tzanakakis G.N., Hjerpe A. Determination of hyaluronan and galactosaminoglycan disaccharides by high-performance capillary electrophoresis at the attomole level. Applications to analyses of tissue and cell culture proteoglycans // *Journ. Chromatogr. A*. 1995. Vol. 696. P. 295–305.

Kim B-M., Lee S-Y., Jeong I-H. Influence of Squid Liver Powder on Accumulation of Cadmium in Serum, Kidney and Liver of Mice // *Prev. Nutr. Food Sci.* 2013. Vol. 18 (1). P. 1–10.

---

Krieg A.M. Antiinfective Applications of Toll-like Receptor 9 Agonist // *Amer. Thoracis Society*. 2007. Vol. 4. P. 289–294.

Laurence D., Massicotte F., Pelletier J.P., Martel–Pelletier J. Subchondral bone sclerosis in osteoarthritis: not just an innocent bystander // *Modem Rheumatol*. 2003. Vol. 13. P.7–14.

Lee A., Langer R. Shark cartilage contains inhibitors of tumor angiogenesis // *Science*. 1983. Vol. 221. P. 1185–1187.

Liang J.H., Wong K.P. The characterization of angiogenesis inhibitor from shark cartilage // *Adv. Exp. Med. Biol.* 2000. Vol. 476. P. 209–232.

Mamelona J., Pelletier E.M., Lalancette K.G., Legault J., Karboune S., Kermasha S. Quantification of phenolic contents and antioxidant capacity of Atlantic sea cucumber, *Cucumaria frondosa* // *Food Chem.* 2007. Vol. 104. P. 1040–1047.

Mehmet A., Hüseyin S., Bekir T., Yilmaz E., Sevim, K. Proximate composition and fatty acid profile of three different fresh and dried commercial sea cucumbers from Turkey // *Int. J. Food Sci. Technol.* 2011. Vol. 46. P. 500–508.

Mendis E., Rajapakse N., Byun H.G., Kim S.K. Investigation of jumbo squid (*Dosidicus gigas*) skin gelatin peptides for their *in vitro* antioxidant effects // *Life Sci*. 2005. 77. Vol. 17. P. 2166–2178.

Miescher F. Die histochemischen und physiologischen Arbeiten // Leipzig: Vogel. 1897. 280 s.

Mojica E.R.E., Merca F.E. Lectin from the body walls of black sea cucumber (*Holothuria atra* J ger) // *Philipp. J. Sci.* 2004. Vol. 133. P. 77–85.

Mourao P.A.S., Pereira M.S. Searching for alternatives to heparin: Sulfated fucans from marine invertebrates // *Trends Cardiovasc. Med.* 1999. Vol. 9. P. 225–232.

Murphy G., Koklitis P., Carne A.F. Dissociation of tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP) from enzyme complexes yields fully active inhibitor // *Biochem. Journ.* 1989. Vol. 261. P. 1031–1034.

Nakchum L., Kim S.M. Preparation of Squid Skin Collagen Hydrolysate as an Antihyaluronidase, Antityrosinase, and Antioxidant Agent // *Prep. Biochem. Biotechnol.* 2015. Jan 8. [Epub ahead of print].

Omidian H., Park K. Introduction to Hydrogels // *Biomed. Appl. Hydrogels Handbook*. Springer: NY, 2010. P. 1–17.

Pacheco R.G., Vicente C.P., Zancan P., Mour o PAS. Different antithrombotic mechanisms among glycosaminoglycans revealed with a new fucosylated chondroitin sulfate from an echinoderm // *Blood Coagul. Fibrinolysis*. 2000. Vol. 11. P. 563–573.

Pendleton A., Arden N., Dougados M. *et al.* EULAR recommendations for the management of osteoarthritis: report of a task force of the Standing Committee for International Clinical Studies Including Therapeutic Trials (ESCISIT) // *Ann. Rheum. Dis.* 2000. Vol. 59. P. 936–944.

---

Qin Z., Jing-feng W., Yong X., Yi W., Sen G., Min L., Chang-hu X. Comparative study on the bioactive components and immune function of three species of sea cucumber // J. Fish. Sci. China. 2008. Available online: // [http://en.cnki.com.cn/Article\\_en/CJFDTOTAL-ZSCK200801022.htm](http://en.cnki.com.cn/Article_en/CJFDTOTAL-ZSCK200801022.htm) accessed on 3 April 2011.

Rafiuddin A. M., Venkateshwarlu U., Jayakumar R. Multilayered peptide incorporated collagen tubules for peripheral nerve repair // Biomaterials. 2004. Vol. 25. P. 85–94.

Ridzwan B. H., Leong T. C., Idid S. Z. The antinociceptive effects of water extracts from sea cucumbers *Holothuria leocospilota* Brandt, *Bohadschia marmoratavitiensis* Jaeger and coelomic fluid from *Stichopus hermannii* // Pak. J. Biol. Sci. 2003. Vol. 6. P. 2068–2072.

Roginsky A., Singh B., Ding X. Z., Collin P., Woodward C., Talamonti M. S., Bell R. H. Adrian, TE. Frondanol (R) -A5p from the sea cucumber, *Cucumaria frondosa* induces cell cycle arrest and apoptosis in pancreatic cancer cells // Pancreas. 2004. Vol. 29. P. 335.

Sakharov I. Y., Litvin F. E., Artyukov A. A. Physicochemical properties of collagenolytic protease-C of the Kamchatka crab // Biochemistry. 1992. Vol. 57 (1). P. 28–32.

Shimada S., Yano O., Inoue H. Antitumor activity of the DNA fraction from *Mycobacterium bovis* BCG. II. Effects on various syngeneic mouse tumors // J. Nat. Cancer Inst. 1985. Vol. 74, № 3. P. 681–688.

Singh N., Kumar R., Gupta S., Dube A., Lakshmi V. Antileishmanial activity *in vitro* and *in vivo* of constituents of sea cucumber *Actinopyga lecanora* // J. Parasitol. Res. 2008. Vol. 103. P. 351–354.

Stonik V. A. Toxins from sea cucumber (*Holothuroids*): chemical structures, properties, taxonomic distribution, biosynthesis and evolution // J. Nat. Toxins. 1999. Vol. 8(2). P. 235–248.

Stracke J. O., Hutton M., Stewart M. et al. Biochemical characterization of the catalytic domain of human matrix metalloproteinase 19. Evidence for a role as a potent basement membrane degrading enzyme // J. Biol. Chem. 2000. Vol. 275 (20). P. 14809.

Sugawara T., Zaima N., Yamamoto A., Sakai S., Noguchi R., Hirata T. Isolation of sphingoid bases of sea cucumber cerberosides and their cytotoxicity against human colon cancer cells // Biosci. Biotechnol. Biochem. 2006. Vol. 70. P. 2906–2912.

Taboada M. C., Gonzalez M., Rodriguez E. Value and effects on digestive enzymes and serum lipids of the marine invertebrate *Holothuria forskali* // Nutr. Res. 2003. Vol. 23. P. 1661–1670

Tian F., Zhang X., Tong Y., Yi Y., Zhang S., Li L., Sun P., Lin L., Ding J. P. E. A new sulfated saponin from sea cucumber, exhibits anti-angiogenic and anti-tumor activities *in vitro* and *in vivo* // Cancer Biol. Ther. 2005. Vol. 4. P. 874–882.

---

Vieira R. P., Mulloy B., Mour o P. A. Structure of a fucose-branched chondroitin sulphate from sea cucumber. Evidence for the presence of 3-O-sulfo- $\beta$ -D-glucuronosyl residues // J. Biol. Chem. 1991. Vol. 266. P. 13530–13536.

Wahyudi O., Kim S. M. Biofunctional activities of squid milt hydrolysate // Proc. Nutr. Soc. 2013. Vol. 72 (OCE4). P. 299.

Wen J., Hu C., Fan S. Chemical composition and nutritional quality of sea cucumbers // J. Sci. Food Agric. 2010. Vol. 90. P. 2469–2474.

Zhao Y., Li B., Liu Z., Dong S., Zhao X., Zeng M. Antihypertensive effect and purification of an ACE inhibitory peptide from sea cucumber gelatin hydrolysate // Proc. Biochem. 2007. Vol. 42. P. 1586–1591.

Zhu Y., Hu J. E. Preparation of bioactive peptides from squid liver and its bioactivity study // J. of Anhui Agricultural Sciences. 2014. Vol. 15. P. 35–36.

БАД к пище на основе гидролизатов гидробионтов, производимые  
ООО «ФАРМ ОУШЕН ЛАБ.»

Название	Источник получения	Состав	Основное назначение	Способ применения
Артрофиш	Хрящевая ткань	Гексоамины, аминокислоты, хондроитин сульфаты, растворимый коллаген	Заболевания опорно-мышечной системы	Для: улучшения состояния больных артритами, артрозами, ревматизмом, остеохондрозом позвоночника; ускорения восстановления функций хрящевой ткани при воспалительных и обменно-дистрофических поражениях суставов; ускорения процесса формирования связок, сухожилий, для укрепления волос, ногтей, повышения эластичности кожи; нормализации процесса отложения кальция в костной ткани; неспецифической защиты хряща от повреждений, вызываемых приемом нестероидных противовоспалительных препаратов и кортикостероидов. В качестве источника аминокислот и минералов для лиц, занятых интенсивным физическим или умственным трудом, а также для лиц, соблюдающих безбелковые диеты; Для: антиоксидантной защиты сетчатки глаз, снятия спазма accommodation, улучшения остроты зрения; профилактики сердечно-сосудистых заболеваний; профилактики и лечения беспокойства, возбуждения, гиперактивности, судорог; усиления иммунитета при инфекционных процессах с целью освобождения организма от возбудителя болезни.
Вытяжка из двусторчатых моллюсков, Билонорм	Двусторчатые моллюски Корбикула	Свободные аминокислоты, таурин, пептиды	Офтальмология, кардиология, антиоксидация	Для: активизации физической и умственной работоспособности, снижения уровня невротизации и эмоциональной напряженности, улучшения памяти; в комплексе лечения различных хронических и острых инфекций,
Продукт из молока лососевых рыб,	Гонады (молоки)	ДНК, олигонуклеотиды, аминокислоты, пептиды	Повышение работоспособности	Для: активизации физической и умственной работоспособности, снижения уровня невротизации и эмоциональной напряженности, улучшения памяти; в комплексе лечения различных хронических и острых инфекций,

ДНКальгин, Бионуклин	физической и умственной		особенно эффективна эта БАД при вирусных инфекциях (грипп, ОРВИ, вирусный гепатит, герпес); ускорения процессов регенерации тканей после оперативных вмешательств, химических и термических ожогов, кровопотерь, анемий; как источник аминокислот и нуклеотидов для лиц, занятых интенсивным физическим или умственным трудом, а также для лиц, соблюдающих безбелковые диеты.
Вытяжка из голотуриевых	Антиоксидация, Хондропротекция	Растворимый коллаген, хондроитин-сульфаты, пептиды. Триглицериды	При: снижении иммунитета (старение, стресс, хронические инфекции); новообразованиях (для коррекции последствий при лучевой и химиотерапии); невоспалительных заболеваниях половых органов (бесплодие, дисменорея, климактерические состояния) заболеваниях костно-мышечной системы (артроз, артрит, остеохондроз, миозит, мигрень, остеопороз); интенсивных физических, умственных и эмоциональных нагрузках; ожогах, послеоперационных состояниях
Продукт из ганглиев кальмаров, Олиготрин	Иммуномодуляция	Пептиды, аминокислоты	Профилактика и лечение иммунодефицитных состояний при инфекционных болезнях, старении организма, отравлениях, обморожениях, стрессах, лечении антибиотиками, неполноценном питании, воздействии радиации и других вредных факторов. Хронические инфекции различного генеза: бактериальные, вирусные, бронхит, пневмония, вирусные гепатиты, опоясывающий герпес, рецидивирующий кератит, увеит (в офтальмологии). Комплексное лечение псориаза, болезни крови и кровятворной системы. Коррекция иммунодефицитных состояний онкологических больных в процессе и после химиотерапии и облучения. Лечение гнойных и воспалительных осложнений после хирургических вмешательств.



Научное издание

*Татьяна Николаевна Пивненко  
Николай Николаевич Ковалев  
Татьяна Николаевна Запорожец  
Наталья Николаевна Беседнова  
Татьяна Алексеевна Кузнецова*

**Ферментативные гидролизаты из гидробионтов  
Тихого океана как основа для создания биологически  
активных добавок к пище и продуктов  
функционального питания**

Редактор  
Технический редактор  
Оператор верстки *С.В. Филатов*

Подписано к печати 2015 г.  
Гарнитура Adonis. Бумага . Формат 60 900/16.  
Печать офсетная. Усл. п. л. . Уч.-изд. л. .  
Тираж 00 экз. Заказ

ФГУП «Издательство Дальнаука»  
690041, г. Владивосток, ул. Радио, 7  
Тел. 231-23-59. E-mail: dalnauka@mail.ru

Отпечатано в Информационно-полиграфическом  
хозрасчетном центре ТИГ ДВО РАН  
690041, г. Владивосток, ул. Радио, 7