

На правах рукописи

СМАГИНА ГАЛИНА ИВАНОВНА

**БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ЭКСТРАКТА ПРЕДСТАТЕЛЬНОЙ
ЖЕЛЕЗЫ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА И
БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ РАЗРАБОТКИ НОВЫХ
ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ**

03.00.23 - биотехнология

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Уфа – 2006

Работа выполнена в филиале ФГУП «НПО «Микроген» «Иммунопрепарат»
(г. Уфа)

Научный руководитель – доктор медицинских наук, профессор
Бобкова Е. В.

Официальные оппоненты – доктор химических наук, профессор
Варламов В. П.

доктор биологических наук, профессор
Ибрагимов Р. И.

Ведущая организация – Всероссийский научно-исследовательский
и технологический Институт биологической
промышленности

Защита состоится 22 июня 2006 г. в 14 часов на заседании диссертационного
совета КМ 002.136.01 при Институте биологии УНЦ РАН
(450054, г. Уфа, ул. 50 лет Октября, 69).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института биологии УНЦ
РАН

Автореферат разослан ____ мая 2006 года.

Ученый секретарь Регионального
диссертационного совета

Уразгильдин Р. В.

1 ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Помимо микроорганизмов, животных и растительных клеток биотехнология использует органы и ткани человека и животных для получения большой группы лечебных препаратов – цитомединов (Яковлев Г. М. и др., 1990; Воробьев А. А., 2004).

Одним из них является предстательная железа крупного рогатого скота (КРС), лиофилизированный очищенный экстракт тканей которой в течение последних 20 лет успешно используется для получения различных лекарственных форм препаратов, предназначенных для лечения воспалительных заболеваний предстательной железы у человека (Яковлев Г. М. и др., 1992).

Как показано предыдущими исследованиями (Хавинсон В. Х. и др., 1997) экстракт из ткани простаты представляет собой сложный комплекс биологически активных молекул различной природы, которым свойственны различная функциональная направленность и сложный, до конца не изученный, механизм действия.

Исходя из многогранности функций, выполняемых предстательной железой в организме можно полагать, что далеко не все функциональные особенности действия ее экстракта изучены и используются. Применение в исследованиях новых технологических и методических подходов, новых функциональных тестов может выявить перспективу получения не одного, а нескольких препаратов с индивидуальными свойствами с возможным их использованием не только в медицине, но и животноводстве.

Цель исследования. Физико-химическая и биологическая характеристика компонентов в составе экстракта из ткани простаты КРС и оценка возможности получения на их основе новых лекарственных препаратов.

Задачи исследования:

1. Методом жидкостной гель-хроматографии исследовать фракционный состав экстракта из ткани простаты КРС, дать физико-химическую и биохимическую характеристику фракций.

2. Изучить особенности биологического действия отдельных фракций экстракта простаты с использованием различных функциональных тестов на: содержание «свободного» тестостерона в периферической крови, рост шерсти у экспериментальных животных, сократительную активность гладкой мускулатуры, артериальное давление.

3. Показать технологическую возможность получения отдельных индивидуальных препаратов с определенной биологической активностью из одного и того же сырья – очищенного экстракта простаты.

4. Установить возможность исключения из технологии энергоемкий и дорогостоящий процесс лиофилизации.

5. Разработать основы технологии получения новых лекарственных форм и новых препаратов из экстракта простаты для возможного применения в медицинской и сельскохозяйственной практике.

Научная новизна. Впервые показана различная функциональная активность нуклеиново-пептидных фракций по физико-химическим характеристикам.

Обнаружены стабилизирующие свойства мальтозы на биологическую активность очищенного экстракта, позволяющие исключить из технологического процесса его лиофилизацию. Новизна технологического решения оформлена в Заявке на патентование (№ 2004112873/15, положительное решение, 2006).

Впервые в экспериментах на белых мышах выявлено, что однократное парентеральное введение экстракта приводит к волновому повышению содержания «свободного» несвязанного тестостерона в периферической крови: через 3, 6 и 72 часа. Выделены и охарактеризованы по физико-химическим и биологическим свойствам фракции, отвечающие за этот эффект, перспективные для разработки препарата, регулирующего уровень «свободного» тестостерона в крови.

Разработан количественный метод контроля специфической биологической активности в тесте повышения уровня эндогенного тестостерона в периферической крови мышей, пригодный для характеристики качества любых лекарственных препаратов, приготовленных на основе экстракта простаты (патент РФ № 2000113922 «Способ определения биологической активности препаратов из ткани предстательной железы», 2002 г).

Впервые на экспериментальных животных показано, что многократное введение экстракта стимулирует у них рост шерсти. Выделены и охарактеризованы по физико-химическим и биохимическим фракции, отвечающие за этот эффект. Определены дозы при различных способах введения.

Выделены и охарактеризованы по физико-химическим и биохимическим свойствам фракции, оказывающие влияние на сократительную способность гладкой мускулатуры и артериальное давление, связанные с присутствием окситоциноподобных пептидов.

Разработаны 3 новых лечебных препарат, содержащие а качестве действующего начала очищенный жидкий очищенный экстракт простаты, новизна которых защищена патентами РФ (№ 2152204, 2002; № 2160114, 2000 и положительным решением на выдачу патента).

Практическая значимость и реализация результатов исследования.

Показано, что очищенный концентрированный экстракт простаты может служить полифункциональным безотходным сырьем для получения новых препаратов с направленными свойствами.

Установлено, что для получения высокоактивного экстракта целесообразно использовать предстательную железу от забоя КРС, проведенного в апреле-августе месяцев.

Обоснована необходимость использования жидких полуфабрикатов для разработки новых лекарственных форм, так как процесс лиофильного высушивания существенно изменяет их количественный и качественный состав.

Предложена жидкая лекарственная форма «Простакор раствор для внутримышечного введения», в состав которой в качестве стабилизирующего агента введена мальтоза. Отработаны доза стабилизатора, модифицированы методы ее качественного и количественного контроля в препарате.

Разработаны биотехнологические основы получения и контроля трех новых лечебных препаратов, содержащих жидкий экстракт из ткани простаты, для нужд здравоохранения.

Разработан и включен в НТД метод количественного контроля биологической активности в тесте повышения уровня «свободного» тестостерона в крови мышей-самцов, пригодный для контроля качества различных лекарственных форм препаратов на основе экстракта простаты.

Дано научно-методическое обоснование возможности использования отдельных фракций экстракта простаты КРС в производстве препаратов для нужд сельского хозяйства. Образцы апробированы с положительным результатом на быках–производителях – донорах спермы для искусственного осеменения и в звероводческом хозяйстве на черно-бурых лисицах.

Результаты проведенных исследований оформлены в виде научно-технической документации на субстанцию «Экстракт из ткани простаты крупного рогатого скота очищенный концентрированный жидкий», «Простакор раствор для внутримышечного введения», суппозитории «Простакор» и «Интерпрост».

Апробация работы. Основные материалы диссертации доложены на Всероссийской научной конференции, посвященной: 95-летию НИИВС им. И.И. Мечникова (Уфа, 2000 г), Всероссийской научной конференции с международным участием, посвященной: 100-летию со дня основания филиала «Иммунопрепарат» ФГУП «НПО «Микроген» МЗ РФ (Уфа, 2005 г.), расширенном заседании общества морфологов при ФГОУ ВПО «Башкирский государственный аграрный университет» (13 мая 2006 г.).

Диссертация апробирована на заседании ученого совета НИИВС им. И.И. Мечникова филиала «Иммунопрепарат» ФГУП «НПО «Микроген» МЗ РФ (протокол № 2 от 28 марта 2000 года).

Публикации. Основные положения диссертационной работы изложены в 5 научных статьях, опубликованных в материалах научно-практических конференций, тематических сборниках вузов. По материалам диссертации получено 3 патента РФ и одно положительное решение по Заявке на патентование.

Объем и структура диссертации. Диссертация изложена на ___ страницах компьютерного текста, состоит из разделов «Общая характеристика работы», «Обзор литературы», «Собственные исследования», «Обсуждение полученных результатов», «Выводы», «Библиографический список».

Библиографический список включает 402 источника, в том числе 128 иностранных. Диссертация содержит ___ таблицы, ___ рисунков.

Основные положения, выносимые на защиту.

1. Жидкий очищенный экстракт из ткани простаты КРС многокомпонентен, содержит пептидно-нуклеиновые фракции с м.м. 0,075-15,0 кДа, неравнозначные по своей функциональной активности, и может служить сырьем для получения ряда новых препаратов с направленными свойствами.

2. Процесс лиофильного высушивания с использованием регламентированного криопротектора глицина изменяет исходный состав экстракта. Использование мальтозы в концентрации 0,03-0,06 г/л в качестве стабилизатора способствует сохранению исходных биологических и физико-химических характеристик в течение 2 лет хранения и позволяет исключить из технологического процесса стадию лиофилизации.

3. Введение экстракта из ткани предстательной железы быков или его отдельных фракций половозрелым мышам-самцам вызывает волнообразное повышение содержания «свободного» тестостерона в периферической крови. Разработанный тест увеличения содержания «свободного» тестостерона в периферической крови может быть использован для количественного контроля биологической активности всех лекарственных форм препаратов, получаемых на основе экстракта ПЖ КРС.

4. Жидкий очищенный экстракт ПЖ КРС или его отдельные фракции (м.м. 6-4 и 14,8-15 кДа) при различных способах введения дозозависимо регулируют рост шерсти у экспериментальных животных.

5. Введение экстракта ПЖ КРС или его отдельных фракций с м.м. 0,075-1, 4-6 и 12,0-14,8 кДа вызывает сокращение гладкой мускулатуры и изменяет артериальное давление (4-6 и 12,0-14,8 кДа).

6. Разработанные биотехнологические основы получения трех новых лечебных медицинских препаратов с использованием жидкого экстракта могут быть масштабированы и применены для их промышленного получения.

7. Выделенные и охарактеризованные по биохимическим, физико-химическим и биологическим свойствам фракции, могут быть использованы как перспективные – для разработки новых препаратов, регулирующих уровень свободного тестостерона в крови и рост шерсти у пушных зверей

2 СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Материалы и методы

Работа выполнена в Уфимском филиале ФГУП «НПО «Микроген» «Иммунопрепарат.

В работе использовали беспородных белых половозрелых мышей (10280 голов), белых крыс породы «Вистар» (60 голов), пегухов породы «Белый Леггорн» (5 голов), беспородных морских свинок черно-белого окраса (275 голов); кроликов породы «Шиншилла» (35 голов).

Объектом изучения являлись парные образцы (n=14) сухих и жидких экстрактов с содержанием от 4 до 6 мг/мл общих пептидов (о.п.) и жидкие экстракты (n=5) из ткани простаты быков с содержанием от 7 до 15 мг/мл о.п., полученные в цехе цитомединов филиала «Иммунопрепарат» ФГУП «НПО «Микроген».

Биохимическая характеристика состава экстракта, наличие в нем глицина проведена с использованием методов спектрофотометрии, потенциометрии и хроматографии на бумаге согласно ВФС 42-2077-91.

Исследования фракционного состава экстракта проводили на хроматографической установке («ЛКВ», Швеция) с использованием колонки с ультрагелем «AcA - 202» и детекцией оптической плотности при длине волны λ 280 нм. Селективность ультрагеля изучена с помощью набора стандартных весовых маркеров с молекулярной массой (м.м.) от 0,075 до 1000 кДа.

Изучение влияния экстракта простаты на содержание тестостерона в исследуемых образцах экстракта и в сыворотке крови мышей-самцов проводили иммуноферментным методом с использованием стандартного набора («BIO RAD», США; «Биолот», Россия) для количественного определения тестостерона в биологических жидкостях.

Исследование способности экстракта из ткани ПЖ быков влиять на рост шерсти проведено на кроликах породы «Шиншилла» и беспородных морских свинок черно-белого окраса. Животным в течение 16 дней вводили жидкий экстракт простаты способами: аппликация, per os и внутримышечная инъекция измеряли в мм длину шерсти.

Исследование способности исследуемых образцов экстрактов влиять на гладкомышечные сокращения проведено на изолированном отрезке подвздошной кишки морской свинки согласно методике (Досье на Раверон, 1989).

Исследование способности экстракта из ткани ПЖ быков вызывать снижение кровяного давления у птиц проводили в сравнении со стандартным государственным образцом окситоцина синтетического согласно ФСП 42-0061-0587-00.

Определение подлинности мальтозы и ее количественное определение в исследуемых образцах экстракта из ткани ПЖ быков проводили по ГОСТ 25794.2-83.

Для приготовления суппозиторий использовали по 5 серий жидких концентратов:

- а) жидкого очищенного концентрированного экстракта простаты, содержащего от 7 до 15 мг/мл общих пептидов и способностью восстанавливать активность щелочной фосфатазы, ингибированной цистеином, не менее 13 %;
- б) человеческого лейкоцитарного альфа - интерферона с противовирусной активностью не менее 40 тыс. МЕ/мл.

Исследование специфической активности интерферона в суппозиториях «Интерпрост» проводили на культуре клеток почек эмбрионов свиней (СПЭВ)

согласно ВФС 42 - 3087-98 в 96-луночных плоскодонных пластиковых планшетах с культурой, выращенной в ростовой среде до образования монослоя.

Микробиологическую чистоту суппозитория проверяли путем прямого посева на среды специальные для проверки микробиологической чистоты суппозитория согласно ГФ XI, вып.2, с.187 и Изменениям от 28.12.95, категории 4 к ГФ XI, вып.2, с.187.

Для исследования эффективности суппозитория, содержащих экстракт простаты использовали сыворотки крови 10 больных хламидийным хроническим простатитом.

Статистическую обработку полученных результатов проводили методом оценки достоверности разницы между парными данными и путем определения среднего арифметического и среднеквадратичного отклонения с использованием t-критерия Стьюдента (Беленький М.Л., 1963). Достоверной считали разницу между сравниваемыми величинами при значении $P < 0,05$.

2.2 Результаты собственных исследований

2.2.1 Биохимическая характеристика и фракционный состав экстракта из ткани простаты быков

Предварительное исследование содержания в очищенном экстракте основных биологически активных молекул: нуклеиновых кислот и пептидов показало наличие в нем низкомолекулярных пептидов ($8,4 \pm 6,7$) мг/мл ($P < 0,05$), и компонентов нуклеиновых кислот ($679,0 \pm 639,8$) мг/мл ($P < 0,05$). Причем содержание последних превосходило в 80,8 раза содержание общих пептидов.

Поскольку, лиофилизированная форма лекарственных препаратов является более удобной для хранения и транспортировки, изучено влияние процесса лиофилизации на основные нормативные характеристики (содержание общих пептидов, способность восстанавливать активность щелочной фосфатазы, ингибированной цистеином и рН) в жидких и лиофилизированных формах экстракта.

Биохимические исследования показали, что в сухих препаратах отмечено снижение на 6,5 - 10,5 % концентрации общих пептидов ($P > 0,01$), ($P > 0,01$) на 8,3-12,8 % способности восстанавливать активность щелочной фосфатазы ($P > 0,01$), при сдвиге рН на 3,7-4,4 % в щелочную сторону ($P > 0,01$).

Фракционирование очищенного экстракта с использованием ультрагеля АсА-202 позволило получить 14 фракций, представленных нуклеиново-пептидными компонентами, разняющимися по м.м. (рис. 1).

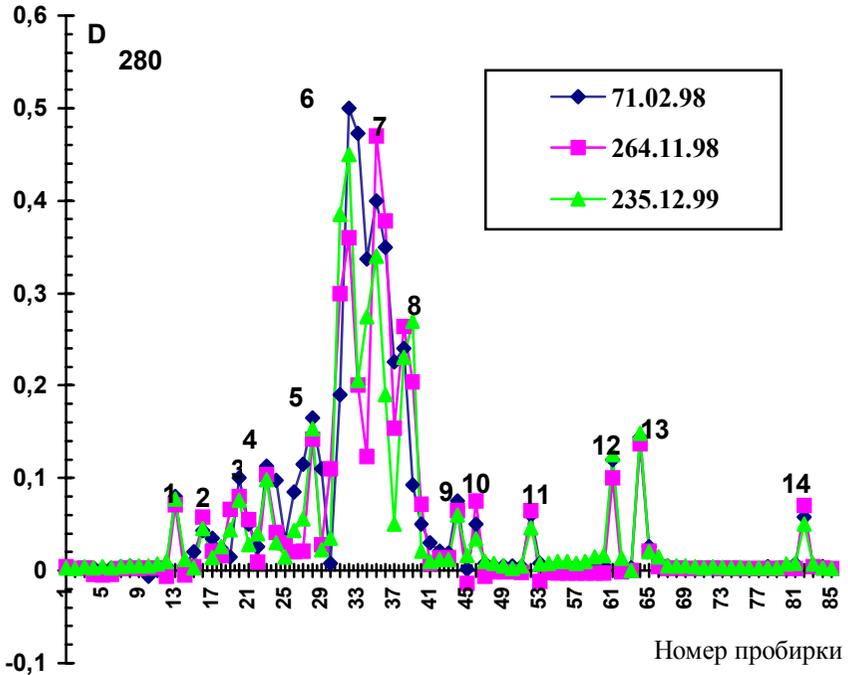


Рис.1. Хроматографический профиль жидких очищенных экстрактов из ткани простаты КРС.

С использованием набора стандартных весовых маркеров с известной м.м. (от 0,075 до 1000 кДа) определена их молекулярная масса ($0,001 < p < 0,01$) и установлена многокомпонентность экстракта простаты. М.м. составляющих его компонентов колебалась от 15 кДа до 0,075 кДа, что позволяет предположить и многофункциональность экстракта.

Сравнительное изучение хроматографических профилей жидкого и лиофильно высушенного экстракта показало, что часть компонентов с м.м. более 11,8850 и менее 1,7783 кДа, присутствующих в жидком экстракте, в сухой форме не определяется. Остальные компоненты сохраняются и полностью повторяют профиль жидкого экстракта, отличаясь меньшей высотой регистрируемых нуклеиново-пептидных пиков.

Зная, что природные гетерополимеры имеют сложную аминокислотную последовательность, самое незначительное изменение которой может привести к нарушению или даже полному исчезновению биологической активности (Терней А., 1981, Ткачева Г. А. и др., 1983),

можно предположить возможные существенные изменения биологических активностей экстракта после сушки.

2.2.2. Влияние отдельных фракций в составе экстракта из ткани простаты быков на содержание эндогенного тестостерона

Применение ряда новых тестов при изучении биологических свойств экстракта простаты быков позволило выявить ряд его функций, не описанных в литературе ранее.

Известно, что простата в своем развитии и функционировании тесно связана с состоянием гормонообразования в системе гипофиз – половые железы и обладает широким спектром воздействия на клетки Лейдинга и кору надпочечников, продуцирующих тестостерон (Егоров А. М. и др., 1991; Nicholson H. D. and Hardy M. P. 1992). Исходя из этого на следующем этапе исследования изучено влияние введенного экстракта и его отдельных фракций на уровень эндогенного тестостерона в сыворотке крови мышей.

Здоровым половозрелым мышам-самцам однократно внутрибрюшинно вводили жидкий очищенный экстракт простаты в установленной экспериментальным путем тест-дозе 1,4 мкг/мышь. Показано, что на протяжении 168 часов наблюдается четырехразовый подъем уровня тестостерона в периферической крови (через 1, 3, 6, 72 часа) (рис. 2).

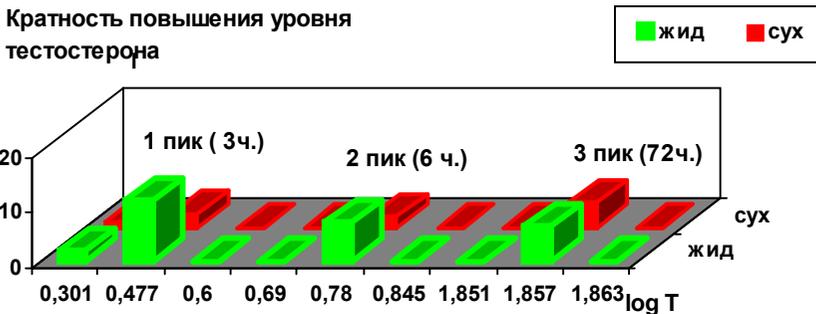


Рис. 2. Периодичность выброса тестостерона в кровь после однократной инъекции тест – доз жидкого и сухого экстрактов в течение 7 суток наблюдения.

По оси ординат – кратность повышения контрольного уровня тестостерона.

По оси абсцисс – T-период наблюдения, в часах (масштаб логарифмический).

При введении мышам сухого экстракта тест-доза для достижения обнаруженного эффекта была увеличена в 15,6 раз (с 1,4 до 11,2 мкг/мышь), при этом максимального значения концентрация тестостерона в крови достигала только к 72 часам.

На основе полученных данных проведено сравнительное исследование 14 производственных серий жидкого экстракта и полученных из них сухих препаратов в тесте стимуляции повышения уровня эндогенного тестостерона в сыворотке крови мышей через трое суток после инъекции тест – доз препаратов: 1,4 и 11,2 мкг/на мышь общих пептидов соответственно. Через 72 ч методом ИФА определяли содержание тестостерона в исследуемых образцах сыворотки с использованием набора для ИФА фирмы «BIO RAD» (США) (рис. 3).

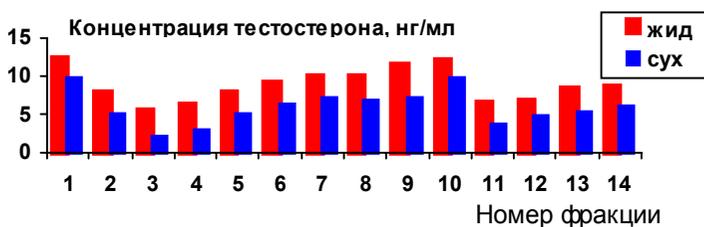


Рис. 3. Содержание тестостерона в сыворотке крови мышей-самцов через трое суток после инъекции тест - доз жидкого (n=14) и сухого экстрактов из ткани простаты быков (n=14).

Достоверно показано ($P < 0,01$), что экстракты простаты быков в установленных тест-дозах (1,4 и 11,2 мкг) через 3 суток после инъекции вызвали повышение уровня сывороточного тестостерона не менее, чем в 4 раза превышающий контроль.

Поскольку, специфическая биологическая активность выпускаемых в нашей стране препаратов из экстракта простаты не контролируется предложенный метод контроля биологической активности препаратов экстракта простаты в тесте усиления выброса тестостерона после однократного внутривнутрибрюшинного введения тест – дозы (патент РФ № 2186387 от 27 июля 2002 г).

Таким образом, обнаруженное нами снижение количественных характеристик компонентов жидкого экстракта и изменение его хроматографического профиля при лиофилизации было подтверждено и изменением его биологической активности в тесте влияния на уровень тестостерона в крови мышей-самцов.

Важная роль тестостерона в регуляции сексуальной активности и его опосредованное влияние на выработку спермы и жизнеспособность сперматозоидов у животных и человека (Молочков В.Ф., Ильин Л.И., 1998) позволяет предположить возможное использование экстракта простаты быков в живот-

новодстве (повышение объема и улучшения качества спермы для искусственного осеменения).

2.2.3 Влияние отдельных фракций компонентов в составе экстракта из ткани простаты быков на рост шерсти подопытных животных

Литературные данные о содержании тестостерона в луковицах волос (Д. Менцлер, 1980) и его влиянии на морфологию волосяных фолликул, дали нам основание провести изучение влияния жидкого экстракта на рост волос у половозрелых животных (кролики и морские свинки) (рис. 4).

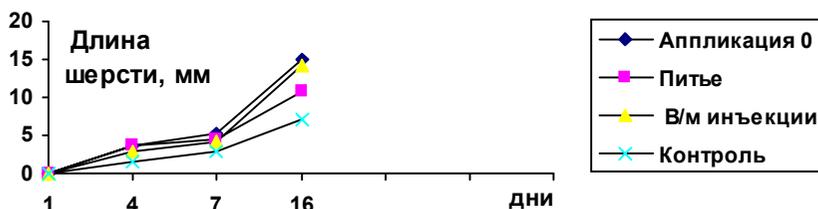


Рис. 4. Динамика роста шерсти у морских свинок при различном способе введения экстракта.

На рисунке показано, что при всех способах введения экстракт стимулировал рост шерсти в используемых концентрациях, которые составляли: 0,405, 0,810, 0,040 мг/на свинку – при аппликации, рег ос и внутримышечном введении соответственно. Длина шерсти, в среднем, составляла, 15,0, 10,7 и 13,2 мм соответственно при 7,0 мм в контроле. Достоверно показано ($P < 0,05$) возрастание не только длины, но и скорости роста шерсти (в 2 раза) у подопытных свинок по сравнению с контролем).

Для выявления компонентов, ответственных за этот эффект, опыт повторен на морских свинках с введением отдельных компонентов, объединенных по близкой о.м.м. (рис. 5).

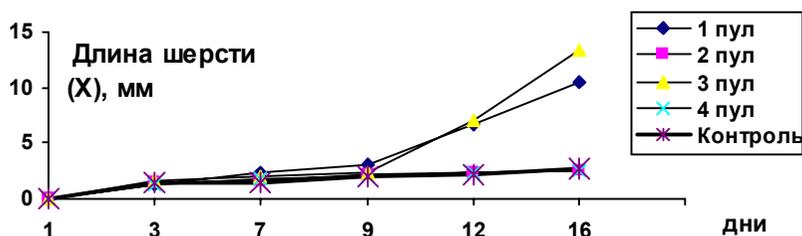


Рис. 5. Динамика роста шерсти у морских свинок после аппликации содержимым пулов 1-4 экстракта из ткани простаты быков в концентрации 12,1 мкг/мл о.п.

Показано, что компоненты, входящие в пулы 1 (м.м. более 14 кДа) и 3 (м.м. от 4,1 до 1,7 кДа), в концентрации 12,1 мкг/мл о.п. стимулируют достоверное ($0,05 < p < 0,02$) увеличение роста шерсти у морских свинок в 4-5 раз соответственно по сравнению с контролем.

Таким образом, выделенные и охарактеризованные по м.м. фракции, могут быть использованы для получения нового препарата, улучшающего качество шерсти у пушных зверей для нужд звероводства.

2.2.4 Влияние отдельных фракций в составе экстракта из ткани простаты быков на сократительную активность гладкой мускулатуры

Простата является железисто-мышечным органом, и сокращение ее гладких мышц способствует выбросу секрета и семяизвержению. Для оценки этих функции экстракта применен известный тест изучения тонуса гладкой мускулатуры подвздошной кишки морской свинки под воздействием раздражителей в двух вариантах: прямого влияния и отмены торможения сокращений гладкой мускулатуры, вызванного хлористым лантаном.

Показано (рис. 6), что введение в реакционную смесь экстракта, содержащего ($9,54 \pm 0,027$) мг/мл о.п., статистически значимо ($0,02 < P < 0,05$) усиливало сокращения подвздошной кишки по сравнению со стандартом, в качестве которого использован раствор хлористого калия (0,1488 г).

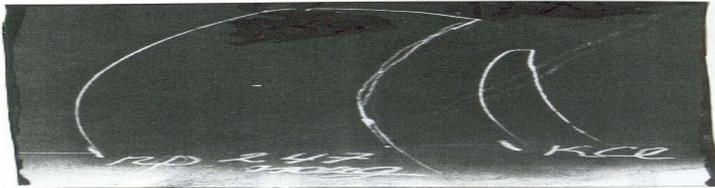


Рис. 6. Способность экстракта-полуфабриката из ткани простаты быков серии 247 стимулировать сокращения гладкой мускулатуры подвздошной кишки морской свинки по методу прямого введения.

При постановке 2 варианта опыта получен аналогичный результат (рис.7).

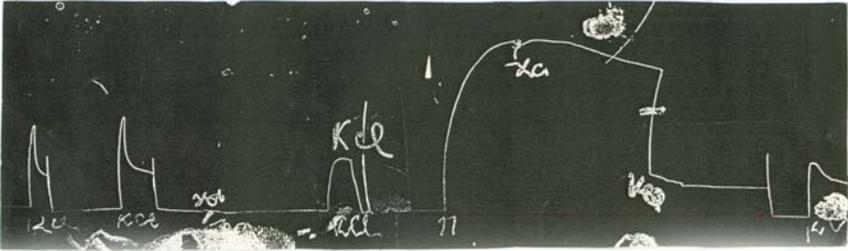


Рис. 7. Способность экстракта из ткани простаты быков серии 2 стимулировать сокращения гладкой мускулатуры подвздошной кишки морской свинки по методу отмены торможения сокращений, вызванного хлористым лантаном.

Установлено, фракции, регулирующие тонус гладкой мускулатуры имеют м.м.: 2 ($14,8 < \text{о.м.м.} < 17,0$ кДа), 4* ($0,8 < \text{о.м.м.} < 1,4$ кДа) и 7* ($0,075 < \text{о.м.м.} < 0,1$ кДа). Одна из них (фракция 4*) с м.м. менее 1,47 кДа и более 754 Да, близка к м.м. окситоцина (1003,0 Да) и, возможно, содержит его.

Известна способность окситоцина вызывать снижение у птиц кровяного давления. С использованием этого метода нами изучено влияние экстракта простаты на артериальное давление у петухов.

На рисунке 8 показано, что экстракт (8 мг/мл) обладает окситоциноподобным эффектом и достоверно ($P < 0,05$) снижает у петухов кровяное давление. В качестве контроля использовали по сравнению окситоцин синтетический.

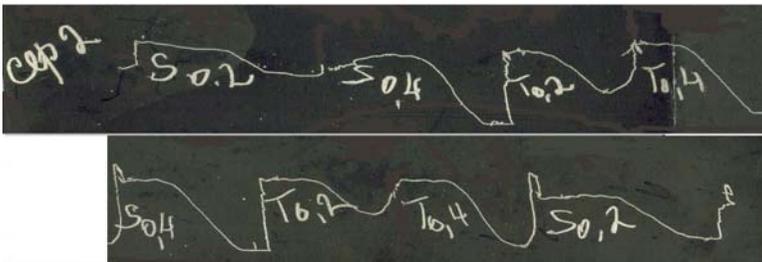


Рис. 8. Способность экстракта из ткани простаты КРС серии 2 снижать кровяное давление у петуха породы «Белый Леггорн».

S_1, S_2 - средние величины изменения артериального давления при введении меньшей и большей дозы S стандартного образца окситоцина (мм);

T_1, T_2 - средние величины изменения артериального давления (АД) при введении меньшей и большей дозы T исследуемых образцов (мм).

Таким образом, можно предположить наличие в составе жидкого экстракта простаты КРС окситоциноподобных пептидов, участвующих в сокращении гладкой мускулатуры.

2.3. Перспектива разработки новых препаратов для нужд медицины

Выявленное преимущество использования жидкого экстракта для разработки новых лекарственных препаратов обусловили необходимость разработки комплекта научно-технической документации (ФСП, Регламент производства) на субстанцию и изучение ее стабильности при хранении.

Субстанция «Экстракт из ткани ПЖ КРС очищенный концентрированный жидкий» представляет собой стерильный раствор, содержащий комплекс необладающих видовой специфичностью низкомолекулярных пептидов (не менее 7 мг/мл) и других биологически активных молекул с молекулярной массой от 15 кДа и ниже и стабильна в течение 15 месяцев хранения.

2.3.1 Простакор - раствор для внутримышечного введения

Выпуск жидкой лекарственной формы Простакора для инъекций позволяет исключить из технологического процесса энергоемкий дорогой процесс лиофильного высушивания и требует дополнительных затрат на приобретение растворителя, кроме того лиофилизация ведет к снижению ряда биологических активностей, т.е. не сохраняет исходный иммунобиологический потенциал препарата.

Исследование сохранения биологической активности жидких образцов в течение 3 лет хранения с использованием в качестве стабилизаторов углеводов-моносахаров (фруктоза, мальтоза, глюкоза, манноза) в тесте повышения уровня сывороточного тестостерона показало, что предъявляемым требованиям отвечает мальтоза в концентрации от 30 до 60 мг/мл в 1 мл. Введение ее в жидкий препарат обеспечивает в течение 2 лет стабильность по качественным показателям, включающим количественное содержание общих пептидов, реакцию щелочной фосфатазы, ингибированной цистеином, токсичность, пирогенность, и не отличается от лиофилизированного препарата.

На новую лекарственную форму «Простакор – раствор для внутримышечного введения, 5мг/мл» оформлена Заявка на патентование (№ 2004112873/15/013845) и получено положительное решение.

Модифицированные методы качественного и количественного контроля мальтозы включены в ФСП на жидкую лекарственную форму Простакора.

2.3.2 Суппозитории «Простакор»

Активным действующим началом разработанной нами формулы ректального лекарственного средства является жидкий очищенный концентрированный экстракт из ткани простаты быков с содержанием о. п. 5 мг. В состав стерильной основы входят недорогие отечественные ингредиенты, разрешенные Фармакопеей: желатин, пластификатор и буферный раствор. Нами проведено сравнительное определение содержания общих пептидов в экстракте спектрофотометрическим методом и по общему азоту в исходном экстракте – полуфабрикате и в приготовленных на его основе суппозиториях (табл. 1)

Таблица 1

Определение концентрации общих пептидов по общему азоту в жидком экстракте и в суппозиториях, приготовленных на его основе

Экстракт	Концентрация общих пептидов, мг/мл *		
	спектрофотометрически	по общему азоту методом Кьельдаля	
	жидкий – полуфабрикат	жидкий - полуфабрикат	суппозиторий
1	5,09±0,0130	5,043±0,0130	5,00±0,012
2	5,13±0,0131	5,115±0,0132	5,07±0,013
3	5,84±0,0151	5,76±0,0148	5,71±0,014
4	5,61±0,0144	5,58±0,0144	5,51±0,014
5	5,39±0,0139	5,315±0,0137	5,20±0,013

Из таблицы видно ($P < 0,001$), что содержание общих пептидов в жидком препарате и в суппозиториях, определенное сравнимыми методами, практически одинаково.

Учитывая перспективность метода определения биологической активности для количественной характеристики препаратов из ткани ПЖ КРС нами исследовано влияние входящих в состав основы для суппозитория ингредиентов на биологическую активность.

В таблице 2 показано ($P < 0,001$), что как при введении жидкого экстракта-полуфабриката и содержащего его растворенного суппозитория в одной тест-дозе, равной 1,4 мкг/мышь содержание тестостерона в сыворотке крови, повышалось, практически, одинаково (различия статистически не значимы).

Содержание тестостерона в крови мышей-самцов после инъекции жидкого экстракта простаты и суппозитория

Наименование препарата	Тест-доза, мкг/ на мышь о.п.*	Концентрация тестостерона X**, нг/мл
жидкий экстракт-полуфабрикат (n=15)	1,4020±0,0255	7,0200±0,0255
Суппозиторий (n=15)	1,4100±0,0257	6,9800±0,0182
Контроль	-	1,0000±0,0182

* P<0,001; ** P<0,001.

При постановке ИФА использована тест-система на тестостерон фирмы «BIO RAD».

Разработанная лекарственная форма – суппозитории с экстрактом из ткани ПЖ быков отвечает всем требованиям Государственной фармакопеи СССР на суппозитории (ГФ XI, 1981) и стабильна по физическим ($0,001 < P < 0,01$) и биологическим свойствам ($P < 0,05$) в течение одного года при соблюдении необходимых условий хранения и транспортировки.

2.3.3. Суппозитории «Интепрост»

Известно, что хронические воспалительные заболевания простаты протекают, как правило, на фоне дефицита клеточного звена иммунитета и неспецифических факторов иммунной защиты: системы комплемента, лизоцима, α -, β - и γ -интерферонов и т.д. (Кротов С. А., Кротова В. А., Юрьев С. Ю., 1998). Задача, на решение которой был направлен следующий этап наших исследований, заключалась в создании комплексного препарата экстракта простаты КРС и интерферона для лечения хронических простатитов, протекающих на фоне иммунодефицита.

Разработанное ректальное средство «Интерпрост» содержит в терапевтических дозах концентрат жидкого очищенного полуфабриката – экстракта из предстательной железы быков и концентрат жидкого очищенного лейкоцитарного альфа-интерферона.

Изучение совместимости входящих в состав суппозиториев биологически активных ингредиентов в сравнении с активностью исходных жидких концентратов интерферона показало соответствие активности интерферона в исходном концентрате и суппозиториях ($32,77 \pm 0,84$) тыс. МЕ/мл.

Определение содержания тестостерона в сыворотке крови мышей-самцов после введения в тест-дозе (1,4 мкг общих пептидов, содержащихся в растворенных суппозиториях и смеси концентратов) достоверно показало ($P < 0,001$) соответствие эффекту, вызываемому экстрактом простаты и составляло ($6,860 \pm 0,017$) нг/мл.

Таким образом, проведенные исследования показали отсутствие антагонистического влияния используемых при производстве суппозиториев концентратов на их биологическую активность и полное ее сохранение в готовой лекарственной форме.

Новизна комплексного препарата «Интерпрост» подтверждена патентом РФ (№ 2160114, 2000 г).

Использование при производстве суппозиториев «интерпрост» стерильных исходных компонентов гарантирует их высокую микробиологическую чистоту. В суппозиториях не обнаружено более 20 бактерий и грибов на 1 г ректального средства при допустимых 1×10^3 аэробных бактерий и 1×10^2 дрожжевых и плесневых грибов при отсутствии *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* (ГФ XI, 1981).

Комбинированное лекарственное средство «Интерпрост» сохраняет все выше перечисленные свойства в течение 6 месяцев при соблюдении условий хранения и транспортировки

Таким образом, использование двух жидких очищенных полуфабрикатов при производстве данного ректального средства позволяет получить высокоэффективный препарат полифункционального действия.

ВЫВОДЫ

1. Жидкий очищенный экстракт простаты многокомпонентен, содержит фракции с м.м. от 0,075 до 17 кДа и может служить безотходным полифункциональным сырьем для получения новых препаратов с направленными свойствами.

2. Обнаружены стабилизирующие свойства мальтозы на жидкие препараты экстракта простаты, введение которой в концентрациях 0,03-0,06 г/л позволяет исключить из технологического процесса стадию лиофилизации.

3. Установлено, что введение экстракта простаты КРС приводит к волнообразному дозозависимому подъему уровня эндогенного тестостерона в периферической крови экспериментальных животных. Выделены и охарактеризованы по биохимическим, физико-химическим и биологическим свойствам фракции перспективные для разработки препарата регулирующего уровень свободного тестостерона в крови.

4. Разработан метод количественного контроля биологической активности препаратов, полученных на основе экстракта простаты в различных лекарственных формах.

5 Установлена дозозависимая регуляция экстрактом простаты роста и качества шерсти у экспериментальных животных. Выделенные и охарактеризованные по свойствам фракции, отвечающие за этот эффект, могут быть использованы для получения нового препарата, повышающего качество меха у пушных зверей в звероводстве.

6 Выделены и охарактеризованы по свойствам фракции очищенного экстракта дозозависимо регулирующие тонус гладкой мускулатуры и артериальное давление, содержащие окситоциноподобные пептиды использование которых перспективно для конструирования новых медицинских препаратов.

7. Разработаны и усовершенствованы технологии получения трех новых лекарственных форм препаратов на основе экстракта простаты: «Простакор жидкий раствор для в/м введения», Суппозитории «Простакор», комбинированный полифункциональный препарат Простакора и интерферона «Интепрост» с оформлением необходимой научно-технической документации.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

1 Пат. 2152204 C1 RU, 7 А 61 К 9/02, 35/48, А 61 Р 13/08, 1/14. Ректальное средство / Е. В. Бобкова, Г. И. Смагина, М. Х. Козырева, Ф. Х. Галиахметов. – Заявл. 19.02.1999; Оpubл. 10.07.2000//Бюл. – 2000. – № 19.

2 Пат. 2160114 C1 RU, 7 А 61 К 35/48, 38/00, 38/21, 9/02. Ректальное средство для лечения хронических простатитов / Е. В. Бобкова, Г. И. Смагина, М. Х. Козырева. – Заявл. 06.10.1999; Оpubл. 10.12.2000//Бюл. – 2000. – № 34.

3 Пат. 2186387 C2 RU, 7 G 01 N 33/48, А 61 К 35/48. Способ определения биологической активности препаратов из ткани предстательной железы/ Е. В. Бобкова, Г. И. Смагина. – Заявл. 31.05.2000; Оpubл. 27.07.2002 // Бюл. – 2002. – № 21.

4 Фархутдинов М. Р. Изучение антиоксидантной активности препарата простатилен /Фархутдинов М.Р., Смагина Г.И., Мельников Н.В., Бобкова Е.В // БГМУ. – СПб, 1999. – С. 81.

5 Смагина Г. И. Изучение фракционного состава препаратов простатилена/ Смагина Г.И., Бобкова Е.В., Мельников Н.В // Актуальные вопросы разработки, производства и применения иммунобиологических и фармацевтических препаратов: Материалы Всероссийской конференции. – Уфа, 2000. Ч. 2. – С.99-102.

6 Смагина Г. И. Биологическая активность простатилена /Смагина Г.И., Бобкова Е.В. // Там же. – С. 102-104.

7 Галиахметов Ф. Х. Эффективность препаратов простатилена при лечении сексуальных дисфункций, обусловленных хроническим простатитом хламидийной этиологии /Галиахметов Ф.Х., Смагина Г.И., Бобкова Е.В. // Там же. – С. 107-109.

8 Аминова Г. З. Нуклеиновые кислоты в составе простакора /Аминова Г.З., Смагина Г.И., Бобкова Е.В., Аминев Р.А. // Медицинские иммунобиологические препараты в XXI веке: Разработка, производство и применение: Материалы Всероссийской конференции с международным участием, посвященный 100-летию со дня основания филиала «Иммунопрепарат» ФГУП «НПО «Микроген» МЗ и СР РФ 7-9 июня 2005 года. – Уфа, 2005. Ч. 2. – С. 301-304.

СМАГИНА ГАЛИНА ИВАНОВНА

**БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ЭКСТРАКТА
ПРЕДСТАТЕЛЬНОЙ ЖЕЛЕЗЫ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА
И БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ РАЗРАБОТКИ
НОВЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ**

16.00.02 – биотехнология

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Ответственный за выпуск М.Х. Шарафутдинов

Подписано в печать 22.05.06 г. Бум. офсетная. Формат 60x84 1/16.

Гарнитура «Times New Roman». Отп. на ризографе.

Усл. печ. л. 1,4. Уч.-изд. л. 1,2. Тираж 100 экз. Заказ № 782.

РИО филиала «Иммунопрепарат» ФГУП «НПО «Микроген» МЗ РФ
450014, г. Уфа, ул. Новороссийская, д. 105, тел.: (3472) 29-92-86

