

Скрининг биологически активных веществ в зависимости от технологических параметров криогенного фракционирования плаценты

С.В. ШАБУНИН¹, Г.А. ВОСТРОИЛОВА¹, И.Е. ШАБАНОВ²

¹Всероссийский ветеринарный институт патологии, фармакологии и терапии, Россия г. Воронеж

²Воронежская государственная технологическая академия, Россия, г. Воронеж

В настоящее время получение новых биологически активных веществ (БАВ) природного происхождения является актуальной задачей современной медицинской и ветеринарной фармацевтики. Одна из основных задач технологии производства таких препаратов – получение действующих биологически активных веществ из природных субстанций с сохранением их физико-химических свойств, биологической активности и создание условий наибольшей экстрактивности ДВ из биосубстрата. Максимальная реализация этих задач возможна при интеграции методов получения БАВ с биологическими методами анализа и контроля качества получаемой продукции.

Из всего спектра технологий получения БАВ из природного материала наиболее перспективными и превалирующими по ряду качественных характеристик являются криогенные технологии, при реализации которых перерабатываемое сырье находится при отрицательных температурах. Ключ к успешной разработке новых препаратов – полноценная интеграция криогенных технологий с фармакологией и биохимией. В настоящей работе представлены примеры передовых интегрированных решений в сфере получения новых биологически активных субстанций на основе плаценты свиней.

В целом общая схема технологии производства БАВ природного происхождения достаточно сложна [1, 2]. Данная технологическая схема адаптирована к требованиям, предъявляемым GMP (в частности, “изолирующие технологии”, асептические условия, отсутствие или минимизация возможности контаминации как между материальными технологическими потоками, так и внешней средой).

Основные этапы получения продукции БАВ природного происхождения следующие: подготовка сырья к переработке, вирусный и бактериологический контроль, криозамораживание, криоизмельчение, криосублимационное фракционирование, хладоновая и водная экстракции, контроль биологической активности, фасовка и упаковка целевых продуктов.

Адрес для корреспонденции: Шабунин С.В., Всероссийский научно-исследовательский ветеринарный институт патологии, фармакологии и терапии, ул. Ломоносова, 114б, г. Воронеж, Российская Федерация 394000; тел.:+7 (0732) 53-98-42

Сохранность биологических структур обеспечивается созданием соответствующих условий: отсутствием контакта с агрессивной внешней средой, в частности с кислородом воздуха и влагой. Это достигается посредством ведения основных процессов переработки в условиях вакуума или защиты инертными газами, например азотом.

В настоящее время имеется большое количество публикаций об использовании различных органов и тканей для создания лекарственных средств, но наиболее эффективными из тканевых препаратов в медицине и ветеринарии являются биорегуляторы, получаемые из плаценты человека и животных.

Плацента – это богатейшая природная кладовая высоко биологически активных веществ, поскольку принадлежит к незаменимому и неотъемлемому механизму жизнеобеспечения плода необходимыми элементами и питательными веществами. В плаценте происходит расщепление и синтез белков, жиров и других веществ, обеспечивающих развитие плода. Плацента очищает кровь, идущую к плоду, дает запас жизнестойкости, защиты от неблагоприятных воздействий и усиливает механизмы, продляющие его жизнь. Восточные народы знали о целебных свойствах плаценты и успешно использовали изготовленный из нее порошок для лечения различных заболеваний еще много веков назад.

Широкий спектр сырьевых источников предполагает получение огромного количества БАВ с заданными свойствами. Поиск и оптимизация определенных стадий технологического процесса возможны благодаря скрининговым работам. Скрининг и фармакологическое изучение новых БАВ включают комплекс экспериментальных моделей, характеризующих значительную часть биологических проявлений активности в зависимости от технологических параметров переработки сырья, а также методы, выявляющие молекулярные механизмы действия препаратов.

Нами разработана принципиальная схема криосублимационного фракционирования плаценты свиней, базовым элементом которой является скрининг, позволяющий с высокой точностью выделять эффективные препараты, предоставлять

необходимый минимум экспериментальных данных для дальнейшего изучения новых препаратов и их внедрения в практику.

Переработка плаценты свиней в соответствии с разработанной технологической схемой позволила получить три совершенно новых биологически активных вещества – криотон, липотон и аминотон.

Принципиальная схема получения криотона включает в себя два основных блока: сублимационное разделение исходного сырья на жидкую и твердую фракции, а также улавливание и выделение паров. Эта жидкость в частности является первым из целевых продуктов, содержащих низкомолекулярные биоактивные вещества (рис. 1). Твердая фракция – исходный материал для последующей переработки с целью получения липофильной фракции.

Криотон содержит комплекс биологически активных веществ: аминокислот, пептидов, гексуроновых кислот, полисахаридов, витаминов, микроэлементов.

Принципиальная схема получения липофильной фракции включает в себя два основных блока: экстракцию липофильной фракции сжиженным хладоном, а также испарения и конденсации экстрагента. Липофильная фракция является вторым из целевых продуктов. Твердый остаток – исходный материал для последующей переработки с целью получения гидрофильной фракции. Данная схема позволяет полностью регенерировать экстрагент, а также вести процесс экстракции параллельно с испарением-конденсацией. Диапазон рабочих температур может варьироваться от 10 до 40°C, что позволяет сильно изменять селективность процесса экстракции. Второй способ изменения селективности – смена экстрагента.

Анализ химического состава липотона позволяет отнести его к группе гепато- и мембранопротекторов. К аналогам липотона можно отнести эссенциале и тыквексол – препараты растительного происхождения. Однако потенциальная биодоступность у липотона выше, поскольку это препарат животного происхождения. Фосфолипиды, которые содержатся в липотоне, играют огромную роль в репарации клеточных мембран (рис. 2).

Принципиальная схема получения гидрофильной фракции включает в себя два основных блока – экстракцию гидрофильных веществ физиологическим раствором (на основе классической схемы технологии экстракции), а также низкотемпературное концентрирование экстрак-

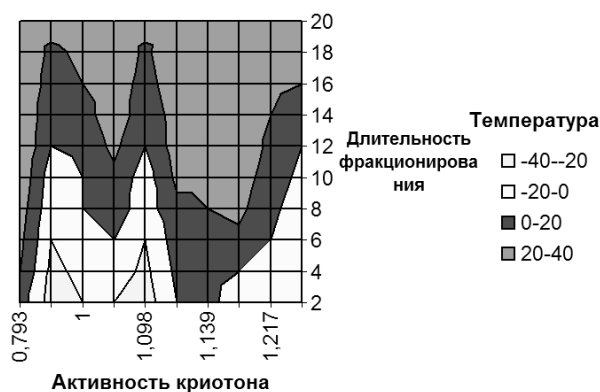


Рис. 1. Диаграмма активности криотона в зависимости от длительности фракционирования и температуры.

та. Гидрофильная фракция является третьим целевым продуктом (рис. 3). Диапазон рабочих температур может варьироваться от 10 до 40°C. Процесс можно интенсифицировать при помощи кавитационного эффекта (струйного, пульсационного или ультразвукового).

Аминотон содержит свободные аминокислоты, а также гексуроновые, нуклеиновые кислоты и в незначительном количестве сахара и полисахариды, вследствие чего его можно отнести к аминокислотным препаратам и иммуномодуляторам. Препарат не содержит белков, поэтому не обладает ни видовой, ни тканевой специфичностью, что практически исключает возникновение аллергических реакций. Ближайшие аналоги аминотона – гидролизаты белков.

Широкие диапазоны варьирования технологических параметров позволяют получать различные по составу (и соответственно по назначению) биоактивные экстракты.

Были получены более 250 различных серий данных препаратов, которые оцениваются тремя основными биологическими методами. Это метод

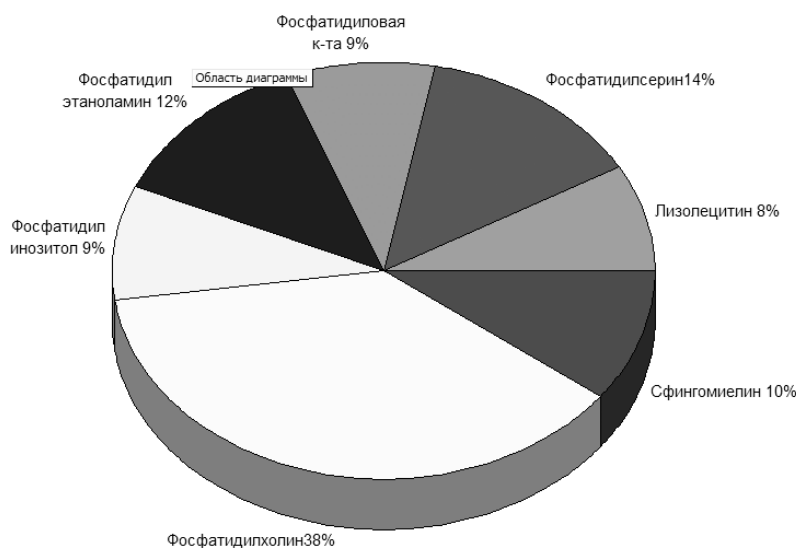


Рис. 2. Состав липофильной фракции плаценты свиней.

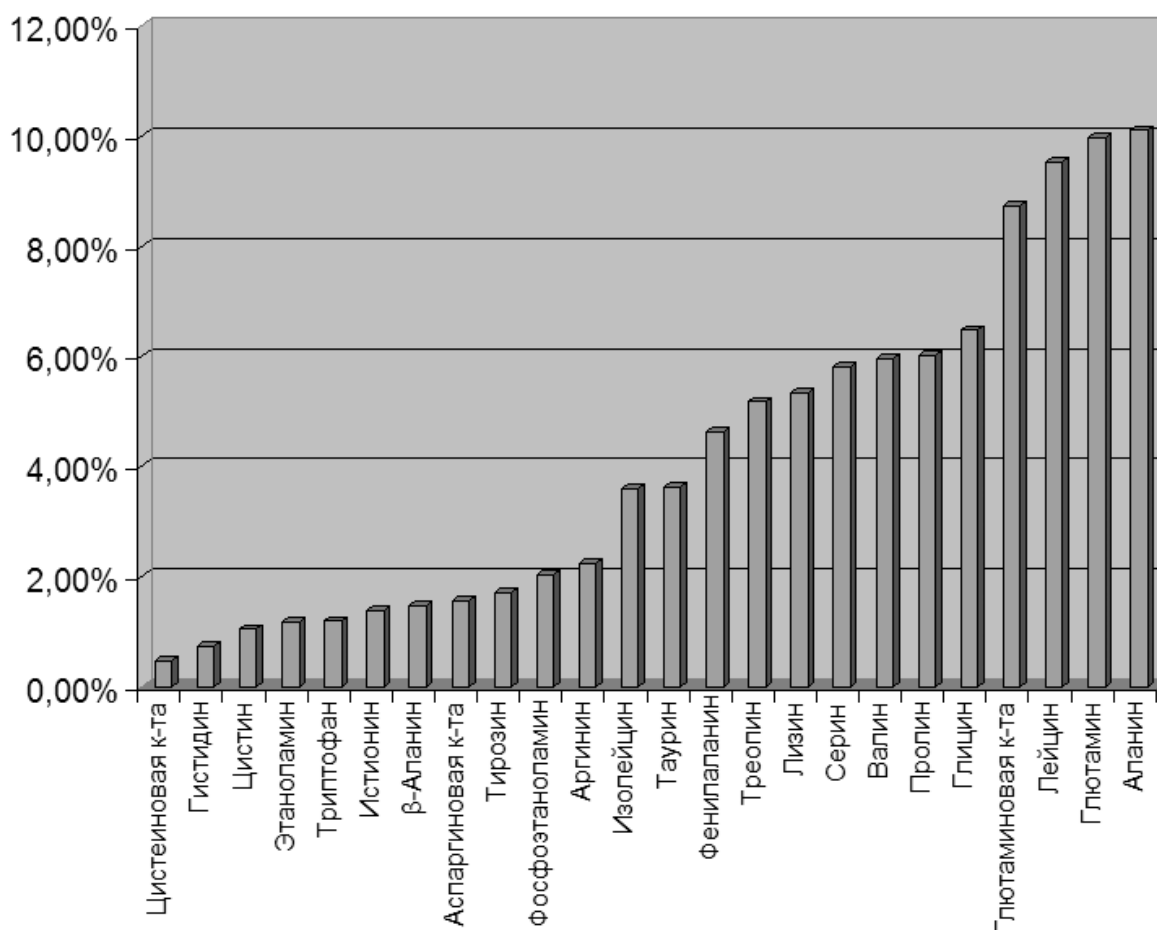


Рис. 3. Аминокислотный состав гидрофильной фракции плаценты.

оценки БА на культурах инфузорий, тест эмоционально-физической нагрузки (белые мыши), модель иммобилизационного стресса (на белых крысах), который сопровождается гипертрофией надпочечников, инволюцией тимуса и селезенки, интенсивным язвообразованием на слизистой оболочке желудка.

Опыты на клеточном уровне проведены с использованием культуры *Paramecium caudatum*, находящейся на стационарной и LAG фазах в соответствии с описанной методикой (авт. свид. СССР № 990189, 1982;)

Исследование на культуре парameций в стационарной фазе роста клеток предусматривает оценку неспецифической стимулирующей активности объекта в условиях функциональной нагрузки. Препарат вносили в среду с парameциями в стационарной фазе роста клеток. Через сутки инкубирования клетки подвергали неблагоприятному воздействию гипертоническим раствором натрия хлорида, вызывающим их 100%-ю гибель. Биологическую активность препаратов оценивали на основании изменения продолжительности жизни инфузорий по отношению к контролю. Результаты исследований показывают повышение резистентности клеток на неблагоприятное

воздействие при применении различных серий криотона, липотона и аминотона, однако степень этих воздействий различна и зависит от технологии получения препаратов, что позволяет использовать данный метод как одну из скрининговых моделей для оценки биологической активности препаратов природного происхождения.

Наиболее интегральной моделью оценки биологической активности препаратов является тест “иммобилизация”, достигаемая 18-часовым обездвиживанием животных в спинном положении. Негативные изменения организма, связанные с острой стрессовой реакцией, в данном случае проявляются выраженной гипертрофией коры надпочечников, инволюцией органов тимико-лимфатической системы, (далее 15) ульцерогеморрагическим поражением слизистой оболочки желудка (триада Селье).

Тест оценки биологической активности препаратов на модели эмоционально-физической нагрузки проверен на модели “плавания” мышей.

Основные технологические критерии получения БАВ с заданными свойствами достигаются путем варьирования:

- температуры экстракции;
- давления в экстракторе;

- оборудования различного механизма действия на определенном этапе технологии (роторно-пульсационный аппарат и пропеллерная мешалка);
- селективный подбор растворителей для экстракции действующих веществ.

Указанные методы были применены и исследованы в более чем 80 сериях криотона, около 100 сериях липотона и около 70 сериях аминотона.

Вышеуказанные серии препаратов были получены при исследовании зависимости биологической активности от градиента температур. В результате данного скрининга получены оптимальные значения температур соответствующих максимальной биологической активности БАВ с заранее прогнозируемыми свойствами.

Литература

1. *Bureau G.* Le premier lyophilisateur continu Industriel // *Revue de la Conserve*, 1971.– Vol. 28, N9.– P. 119-121.
2. *Востроилова Г.А.* Антиоксидантные свойства тканевых препаратов из плаценты, полученных методом криогенной сублимации // *Материалы Международной научно-практической конференции “Свободные радикалы, антиоксиданты и здоровье животных”*.– Воронеж: ВГУ, 2004.– С. 334-336.
3. *Шабунин С.В.* Проблемы криофармакологии // *Ветеринария и корма*.– 2004, №12.– С. 37-38.