



(51) МПК

A61K 35/12 (2015.01)

A61K 36/00 (2006.01)

A61K 38/01 (2006.01)

A61K 38/17 (2006.01)

A61P 43/00 (2006.01)

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА  
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

## (12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК

A61K 35/12 (2021.08); A61K 36/00 (2021.08); A61K 38/01 (2021.08); A61P 43/00 (2021.08)

(21)(22) Заявка: 2020138788, 26.11.2020

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:  
26.11.2020Дата регистрации:  
07.02.2022

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 26.11.2020

(45) Опубликовано: 07.02.2022 Бюл. № 4

Адрес для переписки:

141300, г. Сергиев Посад, ул. 1-ая Рыбная, 82,  
кв. 13, Краснов М.С.

(72) Автор(ы):

Краснов Михаил Сергеевич (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Краснов Михаил Сергеевич (RU)

(56) Список документов, цитированных в отчете  
о поиске: RU 2701566 C1, 30.09.2019. RU  
2238756 C1, 27.10.2004. МАЗИН А.Л.  
Низкомолекулярные РНК эукариот: биогенез,  
субклеточная локализация, функции. //  
Молекулярная биология. 1983, т. 17, вып. 4, с.  
755-781. JIAN GU et al. Small RNA database//  
Nucleic Acids Research. 1997, vol.25, N1, p.98-  
101.

(54) Биологически активная субстанция в виде биорегуляторной композиции, обладающая поддерживающим и восстановительным действием на ткани и органы, и фармакологическая композиция

(57) Реферат:

Группа изобретений относится к биотехнологии и медицине, а именно к биологически активной субстанции в виде биорегуляторной композиции и фармацевтической композиции на ее основе. Биологически активная субстанция в виде биорегуляторной композиции, обладающая поддерживающим и восстановительным действием на ткани и органы, выражающимся в сохранении статуса адгезии клеток и тканей, пролиферации и дифференцировке клеток, а также в поддержании жизнеспособности клеток и предупреждении нарушения целостности тканей и межклеточного пространства, и включающая фракции пептидно-белкового регулятора, выделенные из межклеточного пространства различных тканей животных, растений и грибов, разделенных и собранных методами изoeлектрофокусирования из анодного пространства, с изoeлектрической точкой pI=8,0-10,0 и pI=3,9-5,5, электрофореза и с использованием метода обращенно-фазовой хроматографии ВЭЖХ, и содержащего

регуляторные пептиды с молекулярной массой 1000-10000 Да и белки с молекулярной массой 15-70 кДа, и фракции активных органоспецифических рибонуклеопептидов-регуляторов, выделенных из тех же различных тканей животных, растений и грибов в присутствии нейтрального детергента цетавлона и содержащих низкомолекулярные внутриядерные и цитоплазматические рибонуклеопептиды РНП с константой седиментации 3,5-6,5 S (единиц Сведберга), при этом указанные полученные фракции пептидно-белкового регулятора и активных органоспецифических рибонуклеопептидов-регуляторов для образования субстанции смешаны в соотношении от 1:1 до 3:1 в присутствии  $10^{-3}$  М  $\text{CaCl}_2$ . Фармакологическая композиция, обладающая поддерживающим и восстановительным действием на ткани и органы, выражающимся в сохранении статуса адгезии клеток и тканей, пролиферации и дифференцировке клеток, а также в поддержании жизнеспособности клеток и предупреждении

нарушения целостности тканей и межклеточного пространства, и включающая биологически активную субстанцию в виде биорегуляторной композиции по п. 1 в количестве  $10^{-7}$ - $10^{-14}$  мг/мл и фармацевтически приемлемый носитель, выбранный из группы, включающей водно-солевой физиологический раствор или дистиллированную воду. Вышеописанное решение позволяет расширить арсенал средств, относящихся к получению биологически активной биорегуляторной композиции как биологически активной субстанции, полученной при

взаимодействии входящих в ее состав пептидов, белков и нуклеиновых кислот, выделенных из различных тканей позвоночных животных, растений или грибов, и оказывающей протекторное или восстанавливающее действие на состояние органов и тканей, которое выражается в сохранении статуса адгезии клеток и тканей, пролиферации и дифференцировке клеток, а также в поддержании жизнеспособности клеток и предупреждении нарушения целостности тканей и межклеточного пространства. 2 н.п. ф-лы, 5 табл., 43 ил., 22 пр.





FEDERAL SERVICE  
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.

*A61K 35/12* (2015.01)*A61K 36/00* (2006.01)*A61K 38/01* (2006.01)*A61K 38/17* (2006.01)*A61P 43/00* (2006.01)(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(52) CPC

*A61K 35/12 (2021.08); A61K 36/00 (2021.08); A61K 38/01 (2021.08); A61P 43/00 (2021.08)*(21)(22) Application: **2020138788, 26.11.2020**(24) Effective date for property rights:  
**26.11.2020**Registration date:  
**07.02.2022**

Priority:

(22) Date of filing: **26.11.2020**(45) Date of publication: **07.02.2022** Bull. № 4

Mail address:

**141300, g. Sergiev Posad, ul. 1-aya Rybnaya, 82,  
kv. 13, Krasnov M.S.**

(72) Inventor(s):

**Krasnov Mikhail Sergeevich (RU)**

(73) Proprietor(s):

**Krasnov Mikhail Sergeevich (RU)**

(54) **BIOLOGICALLY ACTIVE SUBSTANCE IN THE FORM OF A BIOREGULATORY COMPOSITION, EXHIBITING A SUPPORTIVE AND RESTORATIVE EFFECT ON TISSUES AND ORGANS, AND PHARMACOLOGICAL COMPOSITION**

(57) Abstract:

FIELD: medicine.

SUBSTANCE: group of inventions relates to biotechnology and medicine, namely, to a biologically active substance in the form of a bioregulatory composition and a pharmaceutical composition based thereon. The biologically active substance in the form of a bioregulatory composition, exhibiting a supportive and restorative effect on the tissues and organs, expressed in preservation of the status of adhesion of cells and tissues, proliferation and differentiation of cells, as well as maintenance of the viability of cell and prevention of violation of the integrity of tissues and the intercellular space, and including fractions of a peptide-protein regulator extracted from the intercellular space of various tissues of animals, plants, and fungi, separated and collected by the methods of isoelectric focusing from the anode compartment, with the isoelectric point  $pI=8.0$  to  $10.0$  and  $pI=3.9$  to  $5.5$ , electrophoresis, and using the method of reverse phase HPLC chromatography, and containing regulatory peptides with a molecular weight of  $1,000$  to  $10,000$ , proteins with a molecular weight of  $15$  to  $70$  kDa, and

fractions of active organ-specific regulator ribonucleopeptides extracted from the same various tissues of animals, plants, and fungi in the presence of a neutral cetavlon detergent and containing low molecular weight intranuclear and cytoplasmic ribonucleopeptides RNP with a sedimentation constant of  $3.5$  to  $6.5$  S (Svedberg units), wherein said obtained fractions of a peptide-protein regulator and active organ-specific regulator ribonucleopeptides, in order to form the substance, are mixed in a ratio from  $1:1$  to  $3:1$  in the presence of  $10^{-3}$  M  $CaCl_2$ . A pharmaceutical composition exhibiting a supportive and restorative effect on tissues and organs, expressed in preservation of the status of adhesion of cells and tissues, proliferation and differentiation of cells as well as maintenance of the viability of cells and prevention of violation of the integrity of tissues and the intercellular space, and including a biologically active substance in the form of the bioregulatory composition from claim 1 in the amount of  $10^{-7}$  to  $10^{-14}$  mg/ml and a pharmaceutically acceptable carrier selected from a

group including a water-salt saline solution or distilled water.

EFFECT: above solution provides a possibility of expanding the range of means related to production of a biologically active bioregulatory composition as a biologically active substance produced in interaction of peptides, proteins, and nucleic acids extracted from various tissues of vertebrates, plants or fungi, included

in said composition, and exhibiting a protective or restorative effect on the condition of organs and tissues, expressed in preservation of the adhesion status of cells and tissues, proliferation and differentiation of cells, as well as maintenance of the viability of cells and prevention of violation of the integrity of tissues and the intercellular space.

2 cl, 5 tbl, 43 dwg, 22 ex

R U 2 7 6 6 0 8 3 C 1

R U 2 7 6 6 0 8 3 C 1

Изобретение относится к биотехнологии и медицине и конкретно - к средствам, стимулирующим репарирование (и регенерацию) повреждений клеток, и может быть использовано в терапии и косметологии, конкретно относится к биорегуляторной композиции (биологически активной субстанции), состоящей из пептидов, белков и нуклеиновых кислот, выделенных из различных тканей позвоночных и беспозвоночных животных (и таких тканей и органов как кровь, головной мозг, тимус, костный мозг и другие, а также растений, таких как - полынь горькая, чистотел, лещина и другие, и грибов - лисички, чага и другие виды (плодовые тела, мицелий), и которая может быть использована в качестве биологически активной субстанции, в качестве основного действующего начала при получении лекарственного препарата для поддержания и восстановления функционального состояния различных тканей.

Биорегуляторную композицию, как биологически активную субстанцию, получают путем соединения выделенных из межклеточного пространства и из ядер клеток позвоночных и беспозвоночных животных, растений или грибов фракции низкомолекулярных рибонуклеопептидов, пептидов и белков.

На биомоделях экспериментально подтверждают репаративный эффект средства, а также показывают, что средство обладает ткане-, органоспецифичностью.

Изобретение позволяет расширить область применения пептидно-белковых композиций, усилить биологические эффекты их действия и получить вещества, функционирующие в организме длительное время без потери способности осуществлять регуляцию функций клеток и корректировать метаболизм при различных патологических нарушениях.

Большинство применяемых в настоящее время лекарств представляют собой определенные природные метаболиты или их синтетические аналоги, т.е. звенья низшего уровня многоплановых структур и систем метаболизма, и действуют на одно конкретное звено метаболизма - белок или фермент. К настоящему времени фармакологи научились корректировать работу приблизительно 500 разных белков из более чем 30000 функционирующих в организме. Однако доказано, что многие с трудом поддающиеся современным средствам или вовсе неизлечимые болезни (диабет, склероз, депрессии, ожирение и др.) представляют собой нарушения 10 и более совместно функционирующих метаболических звеньев, и в отношении некоторых из этих звеньев современные лечебные препараты неэффективны. Естественно, что корректировать работу каждого звена, а затем отрегулировать их совместное функционирование с помощью ограниченного набора узкоспециализированных препаратов практически невозможно. С другой стороны, с помощью известных системных регуляторов целого организма (напр., гормонов, цитокинов) можно стимулировать, ингибировать или вызвать системные перестройки в работе сразу огромного количества разных реакций, большинство из которых не относятся к патологии, которую пытаются таким образом излечить. Недостатком подобного подхода является также то, что избыток гормона или регулируемых им метаболитов воспринимается организмом как сигнал к ингибированию синтеза собственного гормона и его продуктов.

Известно, что в нормально функционирующих органах действуют системы специфических для каждого вида клеток регуляторов, которые синхронизируют работу клеток данного органа и осуществляют обмен информацией и взаимодействие с другими органами и системами клеток. Доказательством функционирования в организме тканеспецифических регуляторных систем являются известные факты гуморального обмена информацией между клетками, согласно которым клетки некоторых тканей в ответ на внешние воздействия, вынуждающие их к адаптационным перестройкам,

способны посылать другим клеткам химические сигналы о своем физиологическом состоянии и команды, необходимые для коррекции функций. По мнению одних авторов, наиболее вероятные переносчики в подобных случаях - белки и низкомолекулярные пептиды, по мнению других - молекулы нуклеиновой природы.

- 5 Из патента RU 2315606, 27.01.2008, известен способ получения лекарственного средства для лечения миопии и заболеваний склеральной оболочки глаза, а также витреоретинопатий, характеризующийся тем, что выделяют из свежэнуклеированных
- 10 глаз позвоночных животных ткань центральной области склеральной оболочки, включающей решетчатую пластинку, промывают ее в водно-солевом физиологическом растворе, выдерживают ткань склеры в водно-солевом растворе при 4-7°C в течение 2-4 ч, центрифугируют тканевой экстракт, собирают надосадочную жидкость, разделяют ее растворением в 100%-ном растворе сульфата аммония при 4-6°C в течение 5-7 дней, фильтруют раствор, диализуют его в диализных мешках при 4-7°C до полного удаления
- 15 ионов сульфата аммония, разделяют его методом изоэлектрофокусирования в градиенте плотности сахарозы при pH 3,5-10,0 температуре 4-6°C и напряжении 500-2000 В в течение 72-96 ч, после чего собирают фракции кислых белков, объединяют их, диализуют до полного удаления сахарозы и амфолинов в диализных мешках при 4-7°C в течение 10-14 дней, полученный при этом водный раствор белка высушивают до получения сухого вещества, которое очищают методом электрофореза в 7,5-15%-ном
- 20 полиакриламидном геле, собирают низкомолекулярную фракцию  $R_f=0,9-0,95$ , содержащую регуляторный пептид, путем элюирования деионизованной водой из геля в течение 2-5 дней при 4-7°C, полученную фракцию диализуют в диализных мешках с пределом пропускания пор 2-8 кДа при 4-7°C в течение 7-10 дней деионизованной водой, отдиализованный раствор регуляторного пептида далее повторно высушивают до
- 25 получения белого хлопьевидного мелкодисперсного порошка, который затем растворяют в физиологическом водно-солевом растворе.

- Из монографии А.А. Константиновский, М.С. Краснов и др «Исследование ранозаживляющего действия биорегуляторов, выделенных из тканей глаза и сыворотки крови быка на модели экспериментальной травмы роговицы у кроликов *in vivo*»,
- 30 Биохимия. 2009, том 74, вып. 9, с. 1195-1203, известны новые биорегуляторы, выделенные из тканей глаза и сыворотки крови быка. Биорегуляторы принадлежат к новой группе биологически активных веществ, обнаруженных ранее в разных тканях животных. Биорегуляторы данной группы локализованы внеклеточно, имеют сложное строение - они содержат белки, углеводы, липиды. Биорегуляторы данной группы влияют на
- 35 адгезию, миграцию, дифференцировку, пролиферацию клеток в тканях, которые являлись источником их выделения. В низких дозах биорегуляторы стимулируют процессы восстановления и репарации в тканях. Показано, что биорегулятор, выделенный из роговицы глаза быка, оказывал выраженное протективное действие на состояние ткани при культивировании роговицы глаза позвоночных животных *in vitro* за счет способности
- 40 дополнительно активировать клеточные источники регенерации. Биорегулятор, выделенный из сыворотки крови, стимулировал ранозаживление роговицы у кролика в эксперименте *in vivo*, а также у человека при посттравматической рецидивирующей эрозии и ожоге роговицы. Биорегулятор, выделенный из пигментного эпителия глаза быка, способствовал стабилизации дифференцировки клеток пигментного эпителия и
- 45 поддержанию жизнеспособности биполярных и мюллеровских клеток в условиях органотипического культивирования тканей глаза *in vitro*.

Все биорегуляторы получали по ранее разработанной схеме выделения и очистки, состоящей из получения тканевого экстракта, высаливания примесных белков в

насыщенном растворе сернокислого аммония, получения фракции супернатанта и последующего разделения ее методом изоэлектрофокусирования в градиенте сахарозы в интервале рН 3.5-10.0. Изучали фракции кислых белков сыворотки крови и роговицы, которые собирали в интервале рН 1.5-3.0, а также основную фракцию пигментного эпителия, собранную в интервале рН 8.5-9.5. В процессе очистки присутствие биорегуляторов во фракциях определяли адгезиометрическим методом, в основе которого лежит оценка их мембранотропной активности. Биорегуляторы исследовали в концентрации, соответствующей  $10^{-12}$  мг белка/мл, которую получали путем последовательного 10-кратного разбавления исходного раствора. Концентрацию белка в исходных фракциях биорегуляторов определяли колориметрическим методом.

Описанные выше биорегуляторы в основном нашли применение в офтальмологии при лечении различных глазных заболеваний.

В частности, из RU 2701566, 30.09.2019 известна фармакологическая композиция, обладающая протекторным действием на состояние тканей заднего отдела глаза - склеральную оболочку, сетчатку, пигментный эпителий, хороид. Данная композиция представляет собой водный раствор белковопептидного комплекса в концентрации  $10^{-7}$ - $10^{-17}$  мг/мл и содержит пептиды с молекулярными массами от 1000 до 6000 Да и белок с молекулярной массой 66000-68000 Да, относящийся к семейству альбуминов сыворотки крови, а также липиды и углеводы. Комплекс получен выделением из склеральной оболочки глаза позвоночных животных ИЭФ-фракций, разделенных и собранных методом изоэлектрофокусирования (ИЭФ) в интервале рН<3,0, смешанных в эквимолекулярных соотношениях. Комплекс получен в результате последовательной экстракции склеральной оболочки глаза позвоночных животных, фракционирования и разделения полученных фракций с использованием метода обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии ВЭЖХ. Данное изобретение обеспечивает сохранение в ткани глаза адгезионных межклеточных взаимодействий, целостность коллагеновых волокон и увеличение жизнеспособности фибробластов, а также поддержание адгезии между тканями заднего отдела глаза, увеличение жизнеспособности клеток, сохранение статуса клеточной адгезии, пролиферации и дифференцировки. Изобретение позволяет получить высокоочищенный препарат, предназначенный для профилактики и лечения глазных заболеваний, связанных с заявленными нарушениями.

Из RU 2422532, 27.06.2011 известен способ выделения низкомолекулярных ядерных рибонуклеопротеидов (РНП) из тканей млекопитающих с использованием нетоксичных и недорогих реагентов. В способе использован дополнительный нейтральный детергент цетавлона для выделения и очищения фракции низкомолекулярных рибонуклеопротеидов от ДНК и высокомолекулярной РНК. Цетавлон образует с ДНК и РНК нерастворимые в воде соли, благодаря чему из раствора можно последовательно осадить ДНК и высокомолекулярные РНК. В результате в растворе остается фракция низкомолекулярных рибонуклеопротеидов, которую затем осаждают с помощью цетавлона. Полученный осадок растворяют в этаноле для осаждения чистых рибонуклеопротеидов. Цетавлоновые соли нуклеиновых кислот устойчивы к действию ферментов РНКаз, благодаря чему данный способ может быть разбит на стадии с большими временными промежутками (до нескольких суток) без потери биологических свойств выделяемых рибонуклеопротеидов. Данный способ выделения позволяет получать низкомолекулярные рибонуклеопротеиды высокой чистоты (содержание РНП в полученных образцах - 90%) в препаративных количествах. Данный известный способ получения низкомолекулярных ядерных рибонуклеопротеидов (РНП) из тканей

и органов млекопитающих, включает выделение фракции клеточных ядер с помощью нейтрального детергента Тритона-X100 с последующим их лизисом посредством додецилсульфата Na (SDS), освобождение полученного гомогената ядер от белков и ДНК с выделением целевого продукта - низкомолекулярных ядерных РНП и

5 переосаждение его этанолом. Освобождение полученного гомогената ядер от белков и ДНК осуществляют с помощью концентрированных растворов NaCl и нейтрального детергента цетавлона (цетилтриметиламмоний бромид), при этом к гомогенату клеточных ядер добавляют 5М ацетата калия до конечной концентрации 1М, инкубируют полученную смесь на холоду в течение 1,5 ч, после чего центрифугируют,

10 к полученному супернатанту добавляют равный объем 1%-ного раствора цетавлона и инкубируют в течение 30 мин, получившуюся суспензию центрифугируют, отделяют супернатант, добавляют к нему равный объем 0,5%-ного раствора цетавлона и инкубируют в течение 2,5-3 ч, получившуюся суспензию центрифугируют, полученный осадок растворяют в 1М NaCl, после чего переосаждают целевой продукт охлажденным

15 этанолом. Низкомолекулярные ядерные рибонуклеопротеиды (РНП) являются генетическими регуляторами, набор которых специфичен для клеток каждой ткани и для каждой стадии онтогенетического развития организма. РНП содержатся в клетках нормальных здоровых организмов, поэтому не обладают токсическим эффектом и слабо отличаются от одного вида животных к другому. В настоящее время они активно

20 исследуются на предмет применения в качестве лекарственных средств и адаптогенов для лечения различных заболеваний человека.

Однако, несмотря на многообразие различных биологически активных веществ, используемых в фармацевтике и медицине, является очевидным, что в настоящее время необходим поиск подобных веществ-регуляторов как внутриклеточных, так и

25 межклеточных, которые обеспечивали бы максимальное сохранение, а при необходимости и усиление, например, эндокринных возможностей или иммунных ответов определенных клеток, усиление репаративных процессов в поврежденных клетках, сдвиг обменных процессов к значениям, характерным для нормального

здорового организма, то есть усиливали бы продукцию регуляторов в случаях, когда

30 она чрезмерно усилена. С помощью современных фармсредств и лечебных препаратов получать подобные эффекты пока не удается.

Технической задачей заявленного изобретения является создание биорегуляторной композиции, состоящей из высокоочищенных пептидов, белков и нуклеиновых кислот из межклеточного пространства, из ядер клеток и из цитоплазмы, которая обеспечивает

35 процесс саморегуляции поддержания и восстановления определенной ткани или систем тканей на нескольких уровнях, как через регуляцию генома внутри ядра, так и регуляцию производства молекул РНК и синтеза белков на них в цитоплазме, так и межклеточной регуляции во внеклеточном пространстве, полностью позволяя, таким образом, организму регулировать все основные процессы, включая клеточную пролиферацию,

40 миграцию, адгезию, дифференцировку и восстановление функциональное и физическое.

В соответствии с поставленной технической задачей техническим результатом заявленного изобретения является расширение арсенала средств (ассортимента), относящихся к получению биологически активной биорегуляторной композиции, как биологически активной субстанции, полученной при взаимодействии входящих в ее

45 состав пептидов, белков и нуклеиновых кислот, выделенных из различных тканей позвоночных животных, растений или грибов, и оказывающей протекторное или восстанавливающее действие на состояние органов и тканей, которое выражается в сохранении статуса адгезии клеток и тканей, пролиферации и дифференцировки клеток,

а также в поддержании жизнеспособности клеток и предупреждении нарушения целостности тканей и межклеточного пространства.

Заявленная в качестве изобретения биологически активная субстанция как биорегуляторная композиция может быть использована в качестве поддерживающего или восстанавливающего средства для различных тканей и органов, а также в качестве биологически активной субстанции для создания новых лекарственных средств для лечения различных заболеваний.

Поставленная техническая задача и технический результат достигаются заявленной группой изобретения, в которую входят биологически активная субстанция в виде, биорегуляторной композиции, обладающая поддерживающим и восстановительным действием на ткани и органы, и фармакологическая композиция, обладающая поддерживающим и восстановительным действием на ткани и органы, используемая при получении лекарственного средства.

Итак, одним из изобретений заявленной группы является биологически активная субстанция в виде биорегуляторной композиции, обладающая поддерживающим и восстановительным действием на ткани и органы, включающая фракции пептидно-белкового регулятора (с концентрациями общего белка  $10^{-5}$ - $10^{-15}$  мг/мл), выделенных из межклеточного пространства различных тканей животных, растений и грибов, разделенных и собранных методами изoeлектрофокусирования из анодного пространства изoeлектрическими точками  $pI=8,0$ - $10,0$  и  $pI=3,9$ - $5,5$ , электрофореза и с использованием метода обращено-фазовой хроматографии ВЭЖХ, и содержащего регуляторные пептиды с молекулярной массой 1000-10000 Да и белки с молекулярной массой 15-70 кДа, а также фракции активных органоспецифических рибонуклеопептидов-регуляторов, выделенных из тех же различных тканей животных, растений и грибов в присутствии нейтрального детергента цетавлона и содержащих низкомолекулярные внутриядерные и цитоплазматические рибонуклеопептиды РНП с константой седиментации 3,5-6,5 S (единиц Сведберга), при этом указанные полученные фракции пептидно-белкового регулятора и активных органоспецифических рибонуклеопептидов-регуляторов для образования субстанции смешаны в соотношении от 1:1 до 3:1 в присутствии  $10^{-3}$  М  $CaCl_2$ . Другим изобретением заявленной группы является фармакологическая композиция, обладающая поддерживающим и восстановительным действием на ткани и органы, и проявляющая активность в сверхмалых дозах, например в дозах, соответствующих концентрациям общего белка  $10^{-5}$ - $10^{-15}$  мг/мл, и используемая при получении лекарственного средства, и которая включает представленную выше в качестве одного из заявленных изобретений биологически активную субстанцию в виде биорегуляторной композиции и фармацевтически приемлемый носитель, например водно-солевой физиологический раствор или дистиллированную воду.

Ниже приводится краткое описание способа получения заявленной в качестве предполагаемого изобретения биологически активной субстанции (биорегуляторной композиции).

В качестве исходного материала для получения биологически активной субстанции (биорегуляторной композиции) используют различные ткани из органов различных позвоночных и беспозвоночных животных [таких как быки\коровы, козы\козлы, овцы\бараны, свиньи\хрюки, крысы, мыши, тритоны, курица и другие птицы, а также их яйца, лягушки, рыбы, а также их икра, морских звезд, пиявок, улиток, моллюсков, ракообразных, паукообразных, голотурий, морских ежей, медуз, пчел, насекомых и др.], из таких тканей и органов [как кровь, головной мозг, тимус, костный мозг,

гипоталамус, гипофиз, эпифиз, сосуды - артерии и вены, кишечник, предстательная железа, желчь, кости, мышцы, хрящевая ткань, селезенка, печень, почки, надпочечники, молочные железы, поджелудочная железа, легкие, сердце, щитовидная железа, яичники, семенники, пещеристое тело, ткани глаза - сетчатка, пигментный эпителий, хрусталик, склера, цилиарное тело, стекловидное тело, зрительный нерв, передняя камера глаза, роговица, радужка,], а также растений, таких как - полынь горькая, чистотел, лещина, береза, одуванчик, морозник, маралий корень, лопух, крапива, свекла, подорожник большой, лук, чеснок, пижма, шалфей, ромашка, валериана, каштана, алоэ, календулы, пустырника, боярышника, зверобоя, люцерны, и др.(листья, стебли или побеги, корни, цветы, почки,)и грибов - лисички, чага, веселка, сморчки, шиитаке, миитаке, и другие виды (плодовые тела, мицелий).

Заявленную биологически активную субстанцию в виде биорегуляторной композиции получают по нижеследующей технологии, находящейся в соответствии с общепринятыми технологиями, используемыми в биотехнологии при выделении и получении биологически активных веществ из различного животного и растительного материала (тканей животных, растений).

В соответствии с заявленным изобретением осуществляют последовательное получение компонентов композиции биологически активной субстанции:

- получают фракции пептидно-белкового регулятора выделением из межклеточного пространства различных тканей животных, растений и грибов, при этом получение пептидно-белкового регулятора включает экстрагирование тканей в водно-солевом растворе или этаноле,
- последующее фильтрование, центрифугирование, сбор надосадочной жидкости, осаждение глобулярных белков путем растворения надосадочной жидкости в растворе сульфата аммония с последовательно увеличивающейся концентрацией его, например концентрации 50-70%,
- фильтрование, повторное высаливание надосадочной жидкости 100%-ным раствором сульфата аммония для осаждения альбуминов из раствора,
- фильтрование, сбор фракции супернатанта и осадка центрифугированием при 20000g,
- растворение осадка и супернатанта в фосфатном буфере,
- диализ до полного удаления из осадка и супернатанта ионов аммония,
- концентрирование фракций осадка и супернатанта,
- последовательное разделение концентрированных фракций супернатанта и осадка сначала методом электрофокусирования в градиенте плотности сахарозы при 0-4°C 74-96 ч, сбор фракций в анодном пространстве и фракции с изоэлектрической точкой  $pI=8,0-10,0$  и  $pI=3,9-5,5$ , диализ их против воды до полного удаления сахарозы и амфолинов, лиофильную сушку,
- и далее разделение методом электрофореза в полиакриламидном геле, сбор фракций с  $Rf=0,5-0,99$ , содержащих регуляторные пептиды, путем элюирования их из геля фосфатным буфером, диализ их,
- разделение полученных фракций методом обращено-фазовой хроматографии ВЭЖХ в градиенте вода/ацетонитрил с получением гидрофильных фракций, содержащие регуляторные пептиды и белки, и удаление из фракции путем диализа против воды ацетонитрила, и используют в активных разведениях, соответствующих концентрациям общего белка  $10^{-5}-10^{-15}$  мг/мл;
- далее получают фракции цитоплазматических и ядерных РНП, способом, включающим:



- гомогенизацию тканей в солевом растворе при низкой температуре и центрифугирование для получения фракций клеточных ядер и фракций цитоплазматической жидкости,

- промывку супернатанта и осадка солевым раствором,

5 - суспендирование в солевом растворе ацетата натрия, содержащем 0,02-0,1М Трис HCl буфер, 0,001-0,05М ЭДТА, 0,5-1% SDS и NaCl 5М до конечной концентрации 1М,

- инкубирование 10-30 мин при 40-60°C,

- последующее центрифугирование при 5000-6000 об/мин 20-60 мин при 4-10°C после охлаждения,

10 - отбор верхней фазы, содержащей РНК,

- добавление к супернатанту равного по объему нейтрального детергента 1% раствора цетавлона,

- инкубирование 30 мин при 20-25°C,

- центрифугирование при 4000 об/мин и 15°C 10 мин,

15 - добавление к супернатанту равного по объему 0,5% раствора детергента цетавлона,

- инкубирование, центрифугирование, растворение осадка в 1М NaCl и осаждение целевого продукта, например 2,5 объемами охлажденного этанола и растворение осадка в дистиллированной воде;

20 - полученный целевой продукт содержит низкомолекулярные внутриядерные и цитоплазматические рибонуклеопептиды РНП с константой седиментации 3,5-6,5 S (единиц Сведберга);

- для образования биологически активной субстанции далее осуществляют последующее смешение этих компонентов в соотношении от 1:1 до 3:1 в присутствии  $10^{-3}$  М  $\text{CaCl}_2$ .

25 Таким образом, является очевидной в настоящее время необходимость поиска и создания подобных веществ-регуляторов как внутриклеточных, так и межклеточных, которые обеспечивали бы максимальное сохранение, а при необходимости и усиление, например, эндокринных возможностей или иммунных ответов определенных клеток, усиление репаративных процессов в поврежденных клетках, сдвиг обменных процессов к значениям, характерным для нормального здорового организма, то есть усиливали бы продукцию регуляторов в случаях, когда она ослаблена, и снижали бы до нормы, когда она чрезмерна усилена. С помощью известных современных фармсредств и лечебных препаратов получать подобные эффекты пока не удается.

35 Поэтому техническая задача, решаемая предлагаемым изобретением, заключается в создании биорегуляторной композиции, состоящей из высокоочищенных молекул (пептидов, белков и нуклеиновых кислот) межклеточного пространства, из ядер клеток и из цитоплазмы, что, таким образом, способствует обеспечиванию процесса саморегуляции поддержания и восстановления определенной ткани или систем тканей сразу на нескольких уровнях, как через регуляцию генома внутри ядра, так и регуляцию производства молекул РНК и синтеза белков на них в цитоплазме, так и межклеточной регуляции во внеклеточном пространстве, таким образом, полностью позволяя организму регулировать все основные процессы, включая клеточную пролиферацию, миграцию, адгезию, дифференцировку и восстановление функциональное и физическое.

40 Данная биорегуляторная композиция может быть использована в качестве поддерживающего или восстановительного средства для различных тканей и органов, а также в качестве субстанции при создании новых лекарственных средств, используемых при лечении различных заболеваний.

Полученная биорегуляторная композиция оказывает выраженное протекторное

действие в дозах, соответствующих  $10^{-5}$ - $10^{-15}$  мг белка/мл на состояние различных тканей.

Краткое описание сущности заявленного изобретения

В общем виде способ выделения и очистки заявленной в качестве изобретения биологически активной субстанции в виде биорегуляторной композиции по изобретению заключается в том, что, например из свежих органов быка или другого позвоночного или беспозвоночного животного, частей любого растения, гриба, выделяют ткани и при этом:

- часть их экстрагируют в водно-солевом растворе или этаноле, фильтруют и центрифугируют тканевой экстракт, собирают надосадочную жидкость, осаждают белки в последовательно увеличивающейся концентрации раствора сульфата аммония, центрифугированием собирают фракцию супернатанта и осадка, после центрифугирования при 20000g, диализуют до полного удаления ионов аммония, разделяют методом изоэлектрофокусирования в градиенте плотности сахарозы при 0-4°C 74-96 часов, собирают фракции анодного пространства и  $pI=8,0-10,0$ ,  $pI=3,9-5,5$  диализуют их, лиофильно высушивают, далее разделяют методом электрофореза в полиакриламидном геле, собирая фракции с  $Rf=0,5-0,99$ , элюируют их из геля, диализуют и разделяют методом обращено-фазовой ВЭЖХ в градиенте вода/ацетонитрилл, получая гидрофильные фракции пептидов и белков (с молекулярной массой в диапазоне пептидов 1000-10000 Да и белков 15000-70000 Да), из которых удаляют ацетонитрил;

- часть тканей гомогенизируют при низкой температуре в солевом растворе, центрифугируют при 7000-8000 об/мин 7-10 мин при 4°C для получения фракций клеточных ядер и фракций цитоплазматической жидкости, промывают и супернатант и осадок в солевом растворе, суспендируют в солевом растворе ацетата натрия, инкубируют 10-30 мин при 40-60°C, после охлаждения центрифугируют 5000-6000 об/мин 20-30 мин при 4-10°C и отбирают верхнюю фазу, содержащую РНК, к супернатанту добавляют равный объем 1% цетавлона и инкубируют 30 мин при  $T=20-25^{\circ}\text{C}$ , центрифугируют 10 мин при 4000 об/мин при 15°C, к супернатанту добавляют равный по объему 0,5% раствор цетавлона, инкубируют 2,5-3 часа при  $T_{\text{комн.}}$ , центрифугируют 20 мин при 10000 об/мин при 15°C, осадок растворяют в 1 М NaCl, после чего осаждают целевой продукт - низкомолекулярные цитоплазматические и ядерные РНП (с константой седиментации 3,5-6,5 S (единиц Сведберга)), например 2,5 объемами охлажденного этанола, осадок отделяют и снова осаждают этанолом, полученный осадок растворяют в дистиллированной воде,

- и далее смешивают фракции межклеточных пептидно-белковых регуляторов и фракции цитоплазматических и ядерных РНП в присутствии  $10^{-3}$  М  $\text{CaCl}_2$  в отношении (1:1 или 3:1).

Изобретение обеспечивает получение высокоочищенной высокоэффективной, обладающей активностью в дозах, соответствующих  $10^{-5}$ - $10^{-15}$  мг/мл биорегуляторной композиции, которая оказывает действие на всех уровнях регуляции, как внутри клетки, так внутри ядра и в межклеточном пространстве.

Другим объектом заявленного изобретения является фармакологическая композиция, которая может быть использована при приготовлении лекарственного препарата для профилактики и лечения различных заболеваний разных органов человека и сельскохозяйственных животных, включающая биологически активную субстанцию в виде биорегуляторной композиции [пептидно-белковый регулятор и рибонуклеопептидный регулятор] и фармацевтически приемлемый носитель.

Данная биорегуляторная композиция как биологически активная субстанция оказывает протекторное и восстанавливающее действие на состояние различных тканей и органов, выражающееся в сохранении статуса адгезии и поддержании межклеточного матрикса и жизнеспособности клеток, предотвращении дегенерации тканей при неблагоприятных условиях.

Решаемая предлагаемым изобретением техническая задача обеспечивается созданием биорегуляторной композиции, состоящей из высокоочищенных молекул (пептидов, белков и нуклеиновых кислот) межклеточного пространства, из ядер клеток и из цитоплазмы, и, таким образом обеспечивается процесс саморегуляции поддержания и восстановления определенной ткани или систем тканей сразу на нескольких уровнях, как через регуляцию генома внутри ядра, так и регуляцию производства молекул РНК и синтеза белков на них в цитоплазме, так и межклеточной регуляции во внеклеточном пространстве, таким образом, полностью позволяя организму регулировать все основные процессы, включая клеточную пролиферацию, миграцию, адгезию, дифференцировку и восстановление функциональное и физическое. Данная биорегуляторная композиция может быть использована в качестве поддерживающего или восстановительного средства для различных тканей и органов, а также в качестве субстанции при создании новых лекарственных средств, используемых при лечении различных заболеваний.

Таким образом, техническая задача и технический результат достигаются группой изобретений, в которую входит биорегуляторная композиция (как биологически активная субстанция), полученная взаимодействием смеси пептидно-белковых молекул из межклеточного пространства различных тканей животных растений или грибов и внутриядерных и цитоплазматических рибонуклеопептидов из различных клеток животных, растений или грибов в различном соотношении от 1:1 до 3:1.

В общем виде способ выделения и очистки заявленной биорегуляторной композиции (биологически активной субстанции) заключается, таким образом, в том, что, например, из свежих органов быка или другого позвоночного (или беспозвоночного) животного, а также частей различных (по существу любых) растений и грибов выделяют ткани и далее:

- часть их экстрагируют в водно-солевом растворе, фильтруют и центрифугируют тканевой экстракт, собирают надосадочную жидкость, осаждают белки в последовательно увеличивающейся концентрации раствора сульфата аммония, центрифугированием собирают фракцию супернатанта и осадка, после центрифугирования при 20000g, диализуют до полного удаления ионов аммония, разделяют методом изоэлектрофокусирования в градиенте плотности сахарозы при 0-4°C 74-96 часов, собирают фракции анодного пространства и  $pI=8,0-10,0$ ,  $pI=3,9-5,5$  диализуют их, лиофильно высушивают, далее разделяют методом электрофореза в полиакриламидном геле, собирая фракции с  $Rf=0,5-0,99$ , элюируют их из геля, диализуют и разделяют методом обращено-фазовой ВЭЖХ в градиенте вода/ацетонитрил, получая гидрофильные фракции пептидов и белков (с молекулярной массой в диапазоне пептидов 1000-10000 Да и белков 15000-70000 Да), из которых удаляют ацетонитрил;

- часть тканей гомогенизируют при низкой температуре в солевом растворе, центрифугируют при 7000-8000 об/мин 7-10 мин при 4°C для получения фракций клеточных ядер и фракций цитоплазматической жидкости, промывают и супернатант и осадок в солевом растворе, суспендируют в солевом растворе ацетата натрия, инкубируют 10-30 мин при 40-60°C, после охлаждения центрифугируют 5000-6000 об/мин 20-30 мин при 4-10°C и отбирают верхнюю фазу, содержащую РНК, к супернатанту

добавляют равный объем 1% цетавлона и инкубируют 30 мин при  $T=20-25^{\circ}\text{C}$ , центрифугируют 10 мин при 4000 об/мин при  $15^{\circ}\text{C}$ , к супернатанту добавляют равный по объему 0,5% раствор цетавлона, инкубируют 2,5-3 часа при  $T_{\text{комн.}}$ , центрифугируют 20 мин при 10000 об/мин при  $15^{\circ}\text{C}$ , осадок растворяют в 1 М NaCl, после чего осаждают

5 целевой продукт - низкомолекулярные цитоплазматические и ядерные РНП (с константой седиментации 3,5-6,5 S (единиц Сведберга)) 2,5 объемами охлажденного этанола, осадок отделяют и снова осаждают этанолом, полученный осадок растворяют в дистиллированной воде,

- и смешивают полученные фракции межклеточных пептидно-белковых регуляторов

10 и фракции цитоплазматических и ядерных РНП в присутствии  $10^{-3}$  М  $\text{CaCl}_2$  в отношении от 1:1 и до 3:1.

Как будет показано ниже, изобретение обеспечивает получение высокоочищенной высокоэффективной, обладающей активностью в сверхмалых дозах, соответствующих

15 концентрациям общего белка  $10^{-5}-10^{-15}$  мг/мл, биорегуляторной композиции (биологически активной субстанции), и фармакологической композиции, содержащей ее, которая оказывает действие на всех уровнях регуляции, как внутри клетки, так внутри ядра и в межклеточном пространстве.

Таким образом, другим объектом заявленного изобретения является

20 фармакологическая композиция для приготовления лекарственного препарата для профилактики и лечения различных заболеваний человека и сельскохозяйственных животных, включающая биорегуляторную композицию (биологически активную субстанцию) [пептидно-белковый регулятор и рибонуклеопептидный регулятор] и фармацевтически приемлемый носитель (например, физиологический раствор,

25 дистиллированная вода, капсулы желатиновые, капсулы целлюлозные, порошки, таблетки и др.).

Данная биорегуляторная композиция оказывает протекторное и восстанавливающее действие на состояние различных тканей и органов, выражающееся в сохранении статуса адгезии и поддержании межклеточного матрикса и жизнеспособности клеток,

30 предотвращении дегенерации тканей при неблагоприятных условиях.

Изобретение иллюстрируется приведенными ниже примерами, в которых описан способ получения биорегуляторной композиции (примеры 1, 2, 3, 4) и определена (указана) специфическая активность заявленной биологически активной субстанции (примеры 5-22), а также фиг. 1-43.

Ниже представлены наименования чертежей (фиг. 1-43).

Фиг. 1. Гистологическая картина нативной артерии крысы.

Ув. Ок.х10, об.х40. а). - Окраска по Ван-Гизону; б) - окраска гематоксилин-эозином.

Фиг. 2. Состояние артерии после 7 дней роллерного культивирования без добавления каких-либо дополнительных факторов (контроль).

Ув. Ок.х10, об.х40. а). - Окраска по Ван-Гизону; б) - окраска гематоксилин-эозином.

Фиг. 3. Состояние артерии после 7 дней роллерного культивирования с добавлением в культуральную среду биорегуляторной композиции из крови.

Ув. Ок.х10, об.х40. а). - Окраска по Ван-Гизону; б) - окраска гематоксилин-эозином.

Фиг. 4. Состояние артерии после 7 дней роллерного культивирования с добавлением в культуральную среду биорегуляторной композиции из листьев лещины.

Ув. Ок.х10, об.х40. а). - Окраска по Ван-Гизону; б) - окраска гематоксилин-эозином.

Фиг. 5. Состояние артерии после культивирования роллерного 7 дней с добавлением в культуральную среду биорегуляторной композиции из аорты, полученной как описано в примере 1.

Ув. Ок.х10, об.х40. а). - Окраска по Ван-Гизону; б) - окраска гематоксилин-эозином.  
 Фиг. 6. Относительная ширина сосудистой оболочки глаза тритона при органотипическом стационарном культивировании заднего отдела глаза.

По оси ординат относительная ширина сосудистой оболочки относительно ширины  
 5 всех оболочек глаза.

Фиг. 7. Состояние сосудистой оболочки и ПЭС глаза тритона PI. waltl. после культивирования заднего отдела глаза тритона *invitro*. ув. ок.х10, об.х40) а) - без добавления (контроль); б) - после добавления в среду культивирования биорегуляторной композиции сетчатки; в) - биорегуляторной композиции пигментного эпителия, г)  
 10 биорегуляторная композиция ягод черники.

Фиг. 8. Морфология жизнеспособных и погибающих клеток сетчатки после культивирования заднего отдела глаза тритона *invitro* в течение 2-х сут: ув. ок.х10, об.х40.

Фиг. 9. Состояние сосудистой оболочки и ПЭС глаза тритона PI. waltl. после  
 15 культивирования *invitro*. Парафиновые срезы (7 мкм). а) - без добавления (контроль, ув. ок.х10, об.х20); б) - после добавления в среду культивирования биорегуляторной композиции сетчатки (ув. ок.х10, об.х20); в) - биорегуляторной композиции ПЭ (ув. ок.х10, об.х20).

Фиг. 10. Гистограммы, отражающие количество отростков клеток Мюллеровской  
 20 глии при культивировании заднего отдела глаза тритона.

Фиг. 11. Ранозаживление роговицы кроликов под воздействием: а) -физиологического раствора; б) - биорегуляторной композиции, выделенной из крови быка; в) - биорегуляторной композиции, выделенной из роговицы глаза быка. Ув. ок.х10, об.х20.

Фиг. 12. Культивирование хрусталиков амфимий: а) контроль (культивирование без  
 25 катарактогенных агентов); б) - воздействие пероксида водорода; в) - воздействие пероксида водорода и биорегуляторной композиции из хрусталика быка.

Фиг. 13. Культивирование хрусталиков амфимий: а) контроль (культивирование без катарактогенных агентов); б) - воздействие хлорида кальция; в) - воздействие хлорида кальция и биорегуляторной композиции из хрусталика быка.

Фиг. 14. Культивирование хрусталиков быка: а) контроль (культивирование без  
 30 катарактогенных агентов); б) - воздействие хлорида кальция; в) - воздействие хлорида кальция и биорегуляторной композиции из хрусталика быка.

Фиг. 15. Культивирование хрусталиков быка: а) контроль (культивирование без катарактогенных агентов); б) - воздействие пероксида водорода; в) - воздействие  
 35 пероксида водорода и биорегуляторной композиции из хрусталика быка.

Фиг. 16. Культивирование хрусталиков крыс: а) контроль (культивирование без катарактогенных агентов); б) - воздействие пероксида водорода; в) - воздействие пероксида водорода и биорегуляторной композиции из хрусталика быка

Фиг. 17. Культивирование хрусталиков крыс: а) контроль (культивирование без  
 40 катарактогенных агентов); б) - воздействие хлорида кальция; в) - воздействие хлорида кальция и биорегуляторной композиции из хрусталика быка.

Фиг. 18. Оптическая плотность при разных длинах волн хрусталиков крыс, культивируемых в: контроль - питательной среде, 1 - в питательной среде, содержащей 0,5 мМ  $H_2O_2$ , 2 - в питательной среде, содержащей 0,5 мМ  $H_2O_2$  и биорегуляторную  
 45 композицию хрусталика быка, 3 - в питательной среде, содержащей 15 мМ  $CaCl_2$ , 4 - в питательной среде, содержащей 15 мМ  $CaCl_2$  и биорегуляторную композицию хрусталика быка.

Фиг. 19 Роллерное культивирование роговицы тритона с областью лимба: а)- контроль, без добавления в среду культивирования каких-либо факторов; б) - с добавлением в среду культивирования биорегуляторной композиции роговицы глаза быка.

5 Фиг. 20. Состояние семенников мыши после 4-х дней культивирования: а) - контроль, просто в питательной среде; б) - опыт, в среде, содержащей биорегуляторную композицию семенников крыс.

Фиг. 21. Состояние поджелудочной железы крысы на гистологическом срезе: а - нативная ткань, б - после индуцированного панкреонекроза, в - после индуцированного панкреонекроза и добавлении биорегуляторной композиции из поджелудочной железы.

10 Фиг. 22. Состояние двенадцатиперстной кишки крысы на гистологическом срезе: а - нативная ткань, б - при индуцированном панкреонекрозе, в - при индуцированном панкреонекрозе и добавлении биорегуляторной композиции поджелудочной железы.

Фиг. 23. Клубочки в почках крысы на гистологическом срезе, окраска гематоксилином-эозином: а - нативная ткань, б - при индуцированном панкреонекрозе, в - при индуцированном панкреонекрозе и добавлении биорегуляторной композиции из поджелудочной железы.

Фиг. 24. Общее количество жизнеспособных фолликулов (1) - в нативных яичниках, (2) - при культивировании яичников, (3) - при культивировании яичников с добавлением биорегуляторной композиции из крови, (4) - с добавлением биорегуляторной композиции из семенников, (5) - с добавлением биорегуляторной композиции из яичников.

По оси ординат среднее количество фолликулов на гистологическом срезе в каждой группе.

Фиг. 25. Гистологические срезы яичников крысы при увеличении x100 (слева) и x40 (справа).

1 - нативные яичники крыс, 2 – контроль - культивирование в обычной питательной среде, 3 - культивирование в среде, содержащей биорегуляторную композицию из крови, 4 - культивирование в среде, содержащей биорегуляторную композицию из семенников, 5 - культивирование в среде, содержащей биорегуляторную композицию из яичников.

30 Фиг. 26. Микрофотография тканей заднего отдела глаза тритона PL waltl после 10-дневного культивирования без добавления биорегуляторной композиции Ув. ок.x10, об.x20.

Фиг. 27 Микрофотографии тканей заднего отдела глаза после 10-дневного культивирования с добавлением исследуемой биорегуляторной композиции из склеры. Ув. ок.x10, об.x20.

Фиг. 28. Роллерное культивирование изолированной склеральной оболочки глаза тритона в течение 28 дней: а - контроль (без добавления биорегуляторной композиции), б - опыт (с добавлением в среду культивирования биорегуляторной композиции склеры глаза быка в концентрации  $10^{-11}$  пмг/мл).

40 Фиг. 29. А - нативный глаз тритона, Б - роллерное культивирование целого глаза тритона в течение 28 суток без добавления биорегуляторной композиции, В - роллерное культивирование целого глаза тритона в течение 28 суток с добавлением биорегуляторной композиции склеры глаза быка в концентрации  $10^{-9}$  мг/мл.

45 Фиг. 30. Гистологическая картина состояния раны кожи мыши после 11 дней. а - нативная кожа, б - (1 группа) - сухой контроль (рана затягивалась первичным натяжением), в - (2 группа) - в рану закапывали физиологический раствор, г - (3 группа) - в рану закапывали биорегуляторную композицию из алоэ, д - (4 группа) - в рану закапывали биорегуляторную композицию из подорожника, е - (5 группа) - в рану

закапывали биорегуляторную композицию из крови.

1 - эпителий, 2 - дерма, 3 - подкожная жировая ткань, 4 - струп, 5 - протоки желез. 6 - волосяные фолликулы.

Фиг. 31. Через 30 дней состояние костного дефекта в контроле (а) и опыте (с добавлением биорегуляторной композиции из крови) (б).

Фиг. 32. Гистология тканей на 5 день при экспериментальной язве желудка у крыс, окраска гематоксилином эозином.

I. а - Нативный желудок, ув. х50; б - двенадцатиперстная кишка, ув. х50; в - срез стенки нативного желудка, ув. х200.

II. Экспериментальная язва желудка крысы: а - область язвы, ув. х50; б - двенадцатиперстная кишка, ув. х50; в - состояние стенки желудка, ув. х200.

III. Экспериментальная язва желудка крысы с применением биорегуляторной композиции крови: а - область язвы, ув. х50; б - двенадцатиперстная кишка, ув. х50; в - состояние стенки желудка, ув. х200.

Фиг. 33. Гистология тканей на 10 день при экспериментальной язве желудка у крыс, окраска гематоксилином эозином.

I. Экспериментальная язва желудка крысы: а - область язвы, б - состояние стенки желудка, ув. х100.

II. Экспериментальная язва желудка крысы с использованием биорегуляторной композиции из крови: а - область язвы, б - состояние стенки желудка, ув. х100.

Фиг. 34. Гистология тканей на 10 день при экспериментальной язве желудка у крыс, окраска альциановым синим.

I. Экспериментальная язва желудка крысы: а - область язвы, б - состояние стенки желудка, ув. х200.

II. Экспериментальная язва желудка крысы с применением биорегуляторной композиции крови: а - область язвы, б - состояние стенки желудка, ув. х200.

Фиг 35. Результаты теста «Постановка конечности» проводимого через 30 минут после введения препаратов на 4 неделе опыта. Результаты представлены в % от результата группы здорового контроля.

1 - здоровые животные, 2 (черный столбик) - негативный контроль с индуцированной болезнью Паркинсона, 3 - группа с болезнью Паркинсона, получавшая биорегуляторную композицию крови, 4 - группа с болезнью Паркинсона, получавшая биорегуляторную композицию мозга, 5 - группа с болезнью Паркинсона, получавшая комбинацию биорегуляторных композиций из мозга и крови, 6 - группа с болезнью Паркинсона, получавшая препарат сравнения L-DOPA.

Значения группы 4 достоверно отличаются ( $p < 0,05$ ) относительно негативного контроля (группа 2).

Фиг 36. Результаты теста «Горизонтальная сетка», полученные через 30 минут после введения препаратов на 3 неделе опыта. По оси ординат представлены значения коэффициента асимметрии в %.

1 - здоровые животные, 2 (черный столбик) - негативный контроль с индуцированной болезнью Паркинсона, 3 - группа с болезнью Паркинсона, получавшая биорегуляторную композицию крови, 4 - группа с болезнью Паркинсона, получавшая биорегуляторную композицию мозга, 5 - группа с болезнью Паркинсона, получавшая комбинацию биорегуляторных композиций из мозга и крови, 6 - группа с болезнью Паркинсона, получавшая препарат сравнения L-DOPA.

Значения Группы 3, 4, 5 достоверно отличаются ( $p < 0,05$ ) относительно негативного контроля (группа 2).

Фиг. 37. Реакция ГЗТ через 24 часа после разрешающей инъекции. Серые столбики - отрицательный контроль (нет реакции ГЗТ).

Черный столбик - контрольная реакция ГЗТ (группа сравнения).

Значения в группах 1, 5 и 7, достоверно отличимые от контрольной группы ГЗТ ( $p < 0,05$ ).

Фиг. 38. Реакция ГЗТ через 24 часа после разрешающей инъекции.

Группа 1 - отрицательный контроль (нет реакции ГЗТ).

Черный столбик (2 группа) - контрольная реакция ГЗТ (группа сравнения).

Данные групп 1 и 4, достоверно отличимые от контрольной группы ГЗТ ( $P < 0,05$ ).

Фиг. 39 Реакция ГЗТ через 48 часов после разрешающей инъекции.

Группа 1 - отрицательный контроль (нет реакции ГЗТ).

Черный столбик - контрольная реакция ГЗТ (группа 2 сравнения).

Данные групп 1 и 4, достоверно отличимые от контрольной группы ГЗТ ( $0X0,05$ ).

Фиг. 40. Реакция ГЗТ.

Группы 1,3,9 - отрицательный контроль (нет реакции ГЗТ).

Черный столбик - контрольная реакция ГЗТ (группа 2 сравнения).

Данные групп 1,3, 5,7 и 9, достоверно отличимые от контрольной группы ГЗТ ( $p < 0,05$ ).

Фиг. 41. Гистологическая картина состояния печени крыс: а - в нативных условиях, б - после индуцированного фиброза, в - после индуцированного фиброза и использования биорегуляторной композиции печени быка.

Фиг. 42. Поперечные срезы простат мышей, культивированных в течение 24 ч: а - контроль, без добавления композиции; б - с добавлением биорегуляторной композиции предстательной железы (10 мг/мл). Увеличение: - окуляр 10х, объектив 4х.

Фиг. 43. Состояния регенератов задней конечности *Pleurodeles waltl* после роллерного культивирования в течение 12 дней *in vitro*: а) - регенерат без культивирования; б) - контроль (без добавления в среду культивирования каких-либо дополнительных факторов); в) - добавление в среду культивирования биорегуляторной композиции крови в концентрации  $10^{-12}$  мг/мл; г) - добавление в среду культивирования FGF- $\beta$  в концентрации  $10^{-10}$  мг/мл; д) - добавление в среду культивирования биорегуляторной композиции кости в концентрации  $10^{-12}$  мг/мл.

Нижеследующие примеры иллюстрируют заявленное изобретение (группу изобретений), но не ограничивают его.

Пример 1.

Выделение биорегуляторной композиции (биологически активной субстанции) из тканей позвоночных животных.

Берут свежую ткань артерии или любую другую ткань позвоночного животного, например быка, очищают от жира и других тканей, удаляют остатки крови, нарезают на небольшие фрагменты 5×5 мм при  $T=20-25^{\circ}\text{C}$  и  $P=730-760$  мм рт.ст. и далее подвергают следующей обработки:

1. Часть фрагментов ткани экстрагируют 5-7 часов при  $T=0-4^{\circ}\text{C}$  в водно-солевом растворе, содержащем 8,75 г/л NaCl (0,875%), 0,186 г/л KCl (0,0186%), 0,111 г/л  $\text{CaCl}_2$  (0,0111%), 0,238 г/л HEPES (0,0238%). Экстракт фильтруют через фильтровальную бумагу и центрифугируют при 3000 об/мин 10-15 мин при  $T=20-25^{\circ}\text{C}$  и  $P=730-760$  мм рт.ст., собирают надосадочную жидкость, осаждают глобулярные белки в последовательно увеличивающейся концентрации растворе сульфата аммония 50-70%, выдерживая 96-120 часов при  $T=0-4^{\circ}\text{C}$ , далее фильтруем через фильтровальную бумагу, осадок отбрасываем и повторно высаливаем надосадочную жидкость 100% раствором сульфата



аммония для удаления альбуминов из раствора при  $T=0-4^{\circ}\text{C}$  в течение 4-7 суток, далее фильтруем через фильтровальную бумагу, центрифугируем при 20000g 20-25 мин и собирают фракцию супернатанта и осадка. Осадок растворяем в фосфатном буфере  $\text{pH}=7,4$ ,  $0,06-0,1\text{M}$  и диализуем против него при  $T=0-4^{\circ}\text{C}$  через диализные мешки с пределом пропускания пор 2-12 кДа, или целлюлозную пленку ГОСТ 7730-89 до полного удаления ионов аммония. Супернатант диализуют против дистиллированной воды при  $T=0-4^{\circ}\text{C}$  через диализные мешки с пределом пропускания пор 2-12 кДа, или целлюлозную пленку ГОСТ 7730-89 до полного удаления ионов аммония. Отсутствие в супернатанте и осадке ионов аммония проверяют с помощью реактива Несслера. Полученные обессоленные фракции осадка и супернатанта концентрируем на роторном испарителе при  $T=18-25^{\circ}\text{C}$ , не повреждая белки температурной обработкой. Далее разделяют концентрированные фракции супернатанта и осадка методом изоэлектрического фокусирования в градиенте плотности сахарозы на колонке LKB 440 (Швеция) используя амфолины (Serva, Швеция) при  $T=0-4^{\circ}\text{C}$  74-96 часов при напряжении 1000-2000 В, собирают фракции анодного пространства (наиболее устойчивые пептидные и белковые компоненты, поскольку там находится фосфорная кислота) и фракции с изоэлектрической точкой  $\text{pI}=8,0-10,0$ ,  $\text{pI}=3,9-5,5$ , диализуют их против воды до полного удаления сахарозы и амфолинов при  $T=0-4^{\circ}\text{C}$  48-96 часов, лиофильно высушивают на лиофильной сушке, далее разделяют методом электрофореза в 9-15% полиакриламидном геле при  $T=20-25^{\circ}\text{C}$  и  $P=730-760$  мм рт.ст., собирая фракции с  $R_f=0,5-0,99$ , элюируют их из геля фосфатным буфером  $0,01\text{M}$   $\text{pH}=7,4$  при  $T=0-4^{\circ}\text{C}$  в течение 48-120 часов, диализуют в диализных мешках (Sigma, Германия) или аналогичных с пределом пропускания пор 2-12 кДа или в целлюлозной пленке ГОСТ 7730-89 при  $T=0-4^{\circ}\text{C}$  в течение 7-14 дней. Далее разделяют полученные фракции методом обращено-фазовой ВЭЖХ в градиенте вода/ацетонитрил 0-70% на колонке C8 или C18, детекция при длине волны 280 нм, получая гидрофильные фракции пептидов и белков (с молекулярной массой пептидов 1000-10000 Да, белков 15000-70000 Да, одним из которых является изоформа сывороточного альбумина) с временем выхода 3-4 мин. Далее из фракции удаляют ацетонитрил путем диализа против воды при  $T=0-4^{\circ}\text{C}$  и используют в активных разведениях, соответствующих  $10^{-7}-10^{-15}$  мг/мл.

2. Часть тканей гомогенизируют при низкой температуре в солевом растворе содержащем Трис-НСl буфер  $0,01\text{M}$   $\text{pH}=7,0$ ,  $\text{CaCl}_2$   $0,001-0,01\text{M}$ ,  $0,3\text{M}$  сахароза,  $0,001\text{M}$  ЭДТА и 1% ТритонХ-100 для выделения клеточных ядер, центрифугируют при 7000-8000 об/мин 7-10 мин при  $4^{\circ}\text{C}$  для получения фракций клеточных ядер (в осадке) и фракций цитоплазматической жидкости (в супернатанте), промывают и супернатант и осадок в солевом растворе Трис-НСl буфер  $0,01\text{M}$   $\text{pH}=7,0$ ,  $\text{CaCl}_2$   $0,001-0,01\text{M}$ ,  $0,3\text{M}$  сахароза,  $0,001\text{M}$  ЭДТА, суспендируют в солевом растворе ацетата натрия  $5\text{M}$ , содержащем  $0,02-0,1\text{M}$  Трис НСl буфер  $\text{pH}=7,6$ ,  $0,001-0,05\text{M}$  ЭДТА,  $0,5-1\%$  SDS и NaCl  $5\text{M}$  до конечной концентрации  $1\text{M}$ , инкубируют 10-30 мин при  $40-60^{\circ}\text{C}$ , после охлаждения центрифугируют 5000-6000 об/мин 20-30 мин при  $4-10^{\circ}\text{C}$  и отбирают верхнюю фазу, содержащую РНК, к супернатанту добавляют равный объем 1% цетавлона и инкубируют 30 мин при  $T=20-25^{\circ}\text{C}$ , центрифугируют 10 мин при 4000 об/мин при  $15^{\circ}\text{C}$ , к супернатанту добавляют равный по объему (1:1)  $0,5\%$  раствор цетавлона, инкубируют 2,5-3 часа при  $T=20-25^{\circ}\text{C}$ , центрифугируют 20 мин при 10000 об/мин при  $15^{\circ}\text{C}$ , осадок растворяют в  $1\text{M}$  NaCl, после чего осаждают целевой продукт - низкомолекулярные цитоплазматические и ядерные РНП (с константой седиментации в интервале 3,0-6,5 S (единиц Сведберга)), например, с 2,5 объемами охлажденного этанола, осадок отделяют и снова осаждают этанолом, полученный осадок растворяют в дистиллированной воде.

Таким же способом, с использованием тех же растворов при тех же температурных режимах, выделяют фракции цитоплазматических рибонуклеопептидов из супернатантов после первого центрифугирования на данном этапе.

3. Объединяют фракции межклеточных пептидно-белковых регуляторов (с молекулярной массой пептидов и белков во фракции, образующих комплекс, в интервале пептидов 1000-10000 Да, белков 15000-70000 Да), получение которых описано в части 1 и фракции цитоплазматических и ядерных рибонуклеопептидных комплексов (константой седиментации во фракции в интервале 3,0-6,5 S (единиц Сведберга)), получение которых описано в части 2 в присутствии  $10^{-3}$  М  $\text{CaCl}_2$  в отношении (1:1 или 3:1) по объему, получая биорегуляторную композицию (биологически активную субстанцию)- высокоэффективный продукт, воздействующий на всех уровнях регуляции, как внутри ядра, внутри клетки в цитоплазме, так и в межклеточном пространстве.

Пример 2. Получение биорегуляторной композиции (биологически активную субстанцию) из тканей растений.

1. Берут свежие молодые листья подорожника большого или любую другую ткань любого другого растения. Нарезаем ткань на небольшие фрагменты 5×5 мм при  $T=20-25^\circ\text{C}$  и  $P=730-760$  мм рт.ст., далее экстрагируем в солевом физиологическом растворе для растений, содержащем  $\text{NH}_4\text{NO}_3$   $2,06 \times 10^{-2}$  М (1,6 г/л или 0,016%),  $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$   $1,5 \times 10^{-3}$  М (0,369 г/л или 0,00369%),  $\text{KCl}$   $1,88 \times 10^{-2}$  М (0,140 г/л или 0,00140%),  $\text{KNO}_3$   $1,88 \times 10^{-2}$  М (1,9 г/л или 0,019%),  $\text{KH}_2\text{PO}_4$   $1,25 \times 10^{-3}$  М (0,171 г/л или 0,00171%),  $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$   $3 \times 10^{-3}$  М (0,333 г/л или 0,00333%)  $\text{pH}=6,0$  в течение 2-4 часов при  $T=0-4^\circ\text{C}$  (выделяем самые активные молекулы, которые выходят сразу, а также при низкой температуре происходит выход межклеточных и секреторных белков и пептидов за счет фазового перехода плазматической мембраны клеток). Экстракт фильтруют через фильтровальную бумагу и центрифугируют при 3000 об/мин 10-15 мин при  $T=20-25^\circ\text{C}$  и  $P=730-760$  мм рт.ст. (чтобы клетки не разрушались и выпали в осадок), собирают надосадочную жидкость, осаждают глобулярные белки в последовательно увеличивающейся концентрации растворе сульфата аммония 50-70% выдерживая 96-120 часов при  $T=0-4^\circ\text{C}$ , далее фильтруем через фильтровальную бумагу, осадок отбрасываем и повторно высаливаем надосадочную жидкость 100% раствором сульфата аммония для осаждения альбуминов из раствора при  $T=0-4^\circ\text{C}$  в течение 4-7 суток, далее фильтруем через фильтровальную бумагу, центрифугируем при 20000g 20-25 мин и собирают фракцию супернатанта и осадка. Осадок растворяем в фосфатном буфере  $\text{pH}=7,4$ , 0,06-0,1 М и диализуем против него при  $T=0-4^\circ\text{C}$  через диализные мешки с пределом пропускания пор 2-12 кДа, или целлюлозную пленку ГОСТ 7730-89 до полного удаления ионов аммония. Супернатант диализуют против дистиллированной воды при  $T=0-4^\circ\text{C}$  через диализные мешки с пределом пропускания пор 2-12 кДа, или целлюлозную пленку ГОСТ 7730-89 до полного удаления ионов аммония. Отсутствие в супернатанте и осадке ионов аммония проверяют с помощью реактива Несслера. Полученные обессоленные фракции осадка и супернатанта концентрируем на роторном испарителе при  $T=18-25^\circ\text{C}$ , не повреждая белки температурной обработкой. Далее разделяют концентрированные фракции супернатанта и осадка методом изоэлектрического фокусирования в градиенте плотности сахарозы на колонке LKB 440 (Швеция) используя амфолины (Serva, Швеция) при  $T=0-4^\circ\text{C}$  74-96 часов при напряжении 1000-2000 В, собирают фракции анодного пространства (наиболее устойчивые пептидные и белковые компоненты, поскольку там находится фосфорная кислота) и фракции с

изоэлектрической точкой  $pI=8,0-10,0$ ,  $pI=3,9-5,5$ , диализуют их против воды до полного удаления сахарозы и амфолинов при  $T=0-4^{\circ}\text{C}$  48-96 часов, лиофильно высушивают на лиофильной сушке, далее разделяют методом электрофореза в 9-15% полиакриламидном геле при  $T=20-25^{\circ}\text{C}$  и  $P=730-760$  мм рт.ст., собирая фракции с  $Rf=0,5-0,99$ , элюируют их из геля фосфатным буфером  $0,01\text{M}$   $pH=7,4$  при  $T=0-4^{\circ}\text{C}$  в течение 48-120 часов, диализуют в диализных мешках (Sigma, Германия) или аналогичных с пределом пропускания пор  $2-12\text{кДа}$  или в целлюлозной пленке ГОСТ 7730-89 при  $T=0-4^{\circ}\text{C}$  в течение 7-14 дней. Далее разделяют полученные фракции методом обращено-фазовой ВЭЖХ в градиенте вода/ацетонитрил 0-70% на колонке C8 или C18, детекция при длине волны 280 нм, получая гидрофильные фракции пептидов и белков с временем выхода 3-4 мин. Далее из фракции удаляют ацетонитрил путем диализа против воды при  $T=0-4^{\circ}\text{C}$  и используют в активных разведениях, соответствующих  $10^{-7}-10^{-15}$  мг/мл.

2. Часть тканей гомогенизируют при низкой температуре в солевом растворе содержащем Трис- $\text{HCl}$  буфер  $0,01\text{M}$   $pH=7,0$ ,  $\text{CaCl}_2$   $0,001-0,01\text{M}$ ,  $0,3\text{M}$  сахароза,  $0,001\text{M}$  ЭДТА и 1% ТритонX-100 для выделения клеточных ядер, центрифугируют при 7000-8000 об/мин 7-10 мин при  $4^{\circ}\text{C}$  для получения фракций клеточных ядер (в осадке) и фракций цитоплазматической жидкости (в супернатанте), промывают и супернатант и осадок в солевом растворе Трис- $\text{HCl}$  буфер  $0,01\text{M}$   $pH=7,0$ ,  $\text{CaCl}_2$   $0,001-0,01\text{M}$ ,  $0,3\text{M}$  сахароза,  $0,001\text{M}$  ЭДТА, суспендируют в солевом растворе ацетата натрия  $5\text{M}$ , содержащем  $0,02-0,1\text{M}$  Трис  $\text{HCl}$  буфер  $pH=7,6$ ,  $0,001-0,05\text{M}$  ЭДТА,  $0,5-1\%$  SDS и  $\text{NaCl}$   $5\text{M}$  до конечной концентрации  $1\text{M}$ , инкубируют 10-30 мин при  $40-60^{\circ}\text{C}$ , после охлаждения центрифугируют 5000-6000 об/мин 20-30 мин при  $4-10^{\circ}\text{C}$  и отбирают верхнюю фазу, содержащую РНК, к супернатанту добавляют равный объем 1% цетавлона и инкубируют 30 мин при  $T=20-25^{\circ}\text{C}$ , центрифугируют 10 мин при 4000 об/мин при  $15^{\circ}\text{C}$ , к супернатанту добавляют равный по объему (1:1)  $0,5\%$  раствор цетавлона, инкубируют 2,5-3 часа при  $T=20-25^{\circ}\text{C}$ , центрифугируют 20 мин при 10000 об/мин при  $15^{\circ}\text{C}$ , осадок растворяют в  $1\text{M}$   $\text{NaCl}$ , после чего осаждают целевой продукт - низкомолекулярные цитоплазматические и ядерные РНП  $2,5$  объемами охлажденного этанола, осадок отделяют и снова осаждают этанолом, полученный осадок растворяют в дистиллированной воде. Таким же способом, с использованием тех же растворов при тех же температурных режимах, выделяют фракции цитоплазматических рибонуклеопептидов из супернатантов после первого центрифугирования на данном этапе.

3. Объединяют фракции межклеточных пептидно-белковых регуляторов (с молекулярной массой пептидов и белков во фракции в интервале пептидов  $1000-10000\text{Да}$ , белков  $15000-70000\text{Да}$ ), получение которых описано в части 1 и фракции цитоплазматических и ядерных рибонуклеопептидных комплексов (с константой седиментации в полученной фракции интервале  $33,0-6,5\text{S}$  (единиц Сведберга)), получение которых описано в части 2 в присутствии  $10^{-3}\text{M}$   $\text{CaCl}_2$  в отношении (1:1 или 3:1) по объему, получая биорегуляторную композицию (биологически активную субстанцию) - высокоэффективный продукт, воздействующий на всех уровнях регуляции, как внутри ядра, внутри клетки в цитоплазме, так и в межклеточном пространстве.

Пример 3. Получение биорегуляторной композиции (биологически активной субстанции) из грибов.

1. Берут свежие молодые плодовые тела гриба лисичка или любую другую ткань любого другого гриба. Нарезаем ткань на небольшие фрагменты  $5\times 5\text{мм}$  при  $T=25^{\circ}\text{C}$  и  $P=760$  мм рт.ст., далее экстрагируем в 70% этиловом спирте в течение 4 часов при  $T=4^{\circ}\text{C}$  (выделяем самые активные молекулы, которые выходят сразу, а также при низкой

температуре происходит выход межклеточных и секреторных белков и пептидов за счет фазового перехода плазматической мембраны клеток). Экстракт фильтруют через фильтровальную бумагу и центрифугируют при 3000 об/мин 15 мин при  $T=25^{\circ}\text{C}$  и  $P=760$  мм рт.ст. (чтобы клетки не разрушались и выпали в осадок), собирают надосадочную жидкость, диализуют против дистиллированной воды, далее осаждают глобулярные белки в последовательно увеличивающейся концентрации растворе сульфата аммония 70% выдерживая 120 часов при  $T=4^{\circ}\text{C}$ , далее фильтруем через фильтровальную бумагу, осадок отбрасываем и повторно высаливаем надосадочную жидкость 100% раствором сульфата аммония для осаждения альбуминов из раствора при  $T=4^{\circ}\text{C}$  в течение 7 суток, далее фильтруем через фильтровальную бумагу, центрифугируем при 20000g 25 мин и собирают фракцию супернатанта и осадка. Осадок растворяем в фосфатном буфере  $\text{pH}=7,4$ , 0,1 М и диализуем против него при  $T=4^{\circ}\text{C}$  через диализные мешки с пределом пропускания пор 2 кДа, или целлюлозную пленку ГОСТ 7730-89 до полного удаления ионов аммония. Супернатант диализуют против дистиллированной воды при  $T=4^{\circ}\text{C}$  через диализные мешки с пределом пропускания пор 2 кДа, или целлюлозную пленку ГОСТ 7730-89 до полного удаления ионов аммония. Отсутствие в супернатанте и осадке ионов аммония проверяют с помощью реактива Несслера. Полученные обессоленные фракции осадка и супернатанта концентрируем на роторном испарителе при  $T=25^{\circ}\text{C}$ , не повреждая белки температурной обработкой. Далее разделяют концентрированные фракции супернатанта и осадка методом изоэлектрического фокусирования в градиенте плотности сахарозы на колонке LKB 440 (Швеция) используя амфолины (Serva, Швеция) при  $T=4^{\circ}\text{C}$  96 часов при напряжении 2000 В, собирают фракции анодного пространства (наиболее устойчивые пептидные и белковые компоненты, поскольку там находится фосфорная кислота) и фракции с изоэлектрической точкой  $\text{pI}=10,0$ ,  $\text{pI}=5,5$ , диализуют их против воды до полного удаления сахарозы и амфолинов при  $T=4^{\circ}\text{C}$  96 часов, лиофильно высушивают на лиофильной сушке, далее разделяют методом электрофореза в 15% полиакриламидном геле при  $T=25^{\circ}\text{C}$  и  $P=760$  мм рт.ст., собирая фракции с  $R_f=0,99$ , элюируют их из геля фосфатным буфером 0,01М  $\text{pH}=7,4$  при  $T=4^{\circ}\text{C}$  в течение 120 часов, диализуют в диализных мешках (Sigma, Германия) или аналогичных с пределом пропускания пор 2 кДа или в целлюлозной пленке ГОСТ 7730-89 при  $T=4^{\circ}\text{C}$  в течение 14 дней. Далее разделяют полученные фракции методом обращено-фазовой ВЭЖХ в градиенте вода/ацетонитрил 0-70% на колонке C8 или C18, детекция при длине волны 280 нм, получая гидрофильные фракции пептидов и белков с временем выхода 4 мин. Далее из фракции удаляют ацетонитрил путем диализа против воды при  $T=4^{\circ}\text{C}$  и используют в активных разведениях, соответствующих  $10^{-15}$  мг/мл.

2. Часть тканей гомогенизируют при низкой температуре в солевом растворе содержащем Трис-НСl буфер 0,01М  $\text{pH}=7,0$ ,  $\text{CaCl}_2$  0,01М, 0,3М сахароза, 0,001М ЭДТА и 1% ТритонХ-100 для выделения клеточных ядер, центрифугируют при 8000 об/мин 10 мин при  $4^{\circ}\text{C}$  для получения фракций клеточных ядер (в осадке) и фракций цитоплазматической жидкости (в супернатанте), промывают и супернатант и осадок в солевом растворе Трис-НСl буфер 0,01М  $\text{pH}=7,0$ , 0,01М, 0,3М сахароза, 0,001М ЭДТА, суспендируют в солевом растворе ацетата натрия 5М, содержащем 0,1М Трис НСl буфер  $\text{pH}=7,6$ , 0,05М ЭДТА, 1% SDS и NaCl 5М до конечной концентрации 1М, инкубируют 30 мин при  $60^{\circ}\text{C}$ , после охлаждения центрифугируют 6000 об/мин 30 мин при 10 С и отбирают верхнюю фазу, содержащую РНК, к супернатанту добавляют равный объем 1% цетавлона и инкубируют 30 мин при  $T=20-25^{\circ}\text{C}$ , центрифугируют 10 мин при 4000 об/мин при  $15^{\circ}\text{C}$ , к супернатанту добавляют равный по объему (1:1) 0,5% раствор цетавлона, инкубируют 3 часа при  $T=25^{\circ}\text{C}$ , центрифугируют 20 мин при 10000

об/мин при 15°C, осадок растворяют в 1 М NaCl, после чего осаждают целевой продукт - низкомолекулярные цитоплазматические и ядерные РНП 2,5 объемами охлажденного этанола, осадок отделяют и снова осаждают этанолом, полученный осадок растворяют в дистиллированной воде. Таким же способом, с использованием тех же растворов при  
 5 тех же температурных режимах, выделяют фракции цитоплазматических рибонуклеопептидов из супернатантов после первого центрифугирования на данном этапе.

3. Объединяют фракции межклеточных пептидно-белковых регуляторов (с молекулярной массой входящих пептидов и белков в составе фракции в интервале  
 10 пептидов 1000-10000 Да, белков 15000-70000 Да), получение которых описано в части 1 и фракции цитоплазматических и ядерных рибонуклеопептидных комплексов (с константой седиментации в интервале 3,0-6,5 S (единиц Сведберга)), получение которых описано в части 2 в присутствии  $10^{-3}$  М в отношении (3:1) по объему, получая  
 15 биорегуляторную композицию (биологически активную субстанцию)-высокоэффективный продукт, воздействующий на всех уровнях регуляции, как внутри ядра, внутри клетки в цитоплазме, так и в межклеточном пространстве.

Пример. 4. Получение биорегуляторной композиции (биологически активной субстанции) из беспозвоночных животных.

Берут свежих морских звезд или любую другую ткань другого беспозвоночного  
 20 животного, нарезают лучи, удаляют гонады и внутренние органы, нарезают на небольшие фрагменты 5x5 мм при T=20°C и P=730 мм рт.ст.

1. Часть фрагментов ткани экстрагируют 5 часов при T=0°C в водно-солевом растворе, содержащем 8,75 г/л NaCl (0,875%), 0,186 г/л KCl (0,0186%), 0,111 г/л CaCl<sub>2</sub> (0,0111%), 0,238 г/л HEPES (0,0238%). Экстракт фильтруют через фильтровальную бумагу  
 25 и центрифугируют при 3000 об/мин 10 мин при T=20°C и P=730 мм рт.ст., собирают надосадочную жидкость, осаждают глобулярные белки в последовательно увеличивающейся концентрации растворе сульфата аммония 50% выдерживая 96 часов при T=0°C, далее фильтруем через фильтровальную бумагу, осадок отбрасываем и  
 30 повторно высаливаем надосадочную жидкость 100% раствором сульфата аммония для осаждения альбуминов из раствора при T=0°C в течение 4 суток, далее фильтруем через фильтровальную бумагу, центрифугируем при 20000g 20 мин и собирают фракцию супернатанта и осадка. Осадок растворяем в фосфатном буфере pH=7,4, 0,06М и  
 35 диализуем против него при T=0°C через диализные мешки с пределом пропускания пор 12кДа, или целлюлозную пленку ГОСТ 7730-89 до полного удаления ионов аммония. Супернатант диализуют против дистиллированной воды при T=0°C через диализные мешки с пределом пропускания пор 12кДа, или целлюлозную пленку ГОСТ 7730-89 до  
 40 полного удаления ионов аммония. Отсутствие в супернатанте и осадке ионов аммония проверяют с помощью реактива Несслера. Полученные обессоленные фракции осадка и супернатанта концентрируем на роторном испарителе при T=18°C, не повреждая белки температурной обработкой. Далее разделяют концентрированные фракции супернатанта и осадка методом изоэлектрического фокусирования в градиенте  
 45 плотности сахарозы на колонке LKB 440 (Швеция) используя амфолины (Serva, Швеция) при T=0°C 74 часов при напряжении 1000 В, собирают фракции анодного пространства (наиболее устойчивые пептидные и белковые компоненты, поскольку там находится фосфорная кислота) и фракции с изоэлектрической точкой pI=8,0, pI=3,9, диализуют их против воды до полного удаления сахарозы и амфолинов при T=0°C 48 часов, лиофильно высушивают на лиофильной сушке, далее разделяют методом электрофореза в 9% полиакриламидном геле при T=20°C и P=730 мм рт.ст., собирая фракции с Rf=0,5,

элюируют их из геля фосфатным буфером 0,01М рН=7,4 при T=0°C в течение 48 часов, диализуют в диализных мешках (Sigma, Германия) или аналогичных с пределом пропускания пор 12 кДа или в целлюлозной пленке ГОСТ 7730-89 при T=0°C в течение 7 дней. Далее разделяют полученные фракции методом обращено-фазовой ВЭЖХ в градиенте вода/ацетонитрил 0-70% на колонке C8 или C18, детекция при длине волны 280 нм, получая гидрофильные фракции пептидов и белков с временем выхода 3 мин. Далее из фракции удаляют ацетонитрил путем диализа против воды при T=0°C и используют в активных разведениях, соответствующих  $10^{-7}$  мг/мл.

2. Часть тканей гомогенизируют при низкой температуре в солевом растворе содержащем Трис-НСl буфер 0,01М рН=7,0, 0,001М, 0,3М сахара, 0,001М ЭДТА и 1% ТритонХ-100 для выделения клеточных ядер, центрифугируют при 7000 об/мин 7 мин при 4°C для получения фракций клеточных ядер (в осадке) и фракций цитоплазматической жидкости (в супернатанте), промывают и супернатант и осадок в солевом растворе Трис-НСl буфер 0,01М рН=7,0, 0,001М, 0,3М сахара, 0,001М ЭДТА, суспендируют в солевом растворе ацетата натрия 5М, содержащем 0,02М Трис НСl буфер рН=7,6, 0,001М ЭДТА, 0,5% SDS и NaCl 5М до конечной концентрации 1М, инкубируют 10 мин при 40°C, после охлаждения центрифугируют 5000 об/мин 20 мин при 4-10°C и отбирают верхнюю фазу, содержащую РНК, к супернатанту добавляют равный объем 1% цетавлона и инкубируют 30 мин при T=20°C, центрифугируют 10 мин при 4000 об/мин при 15°C, к супернатанту добавляют равный по объему (1:1) 0,5% раствор цетавлона, инкубируют 2,5 часа при T=20°C, центрифугируют 20 мин при 10000 об/мин при 15°C, осадок растворяют в 1 М NaCl, после чего осаждают целевой продукт - низкомолекулярные цитоплазматические и ядерные РНП 2,5 объемами охлажденного этанола, осадок отделяют и снова осаждают этанолом, полученный осадок растворяют в дистиллированной воде. Таким же способом, с использованием тех же растворов при тех же температурных режимах, выделяют фракции цитоплазматических рибонуклеопептидов из супернатантов после первого центрифугирования на данном этапе.

3. Объединяют фракции межклеточных пептидно-белковых регуляторов (с молекулярной массой их во фракции и в интервале пептидов 1000-10000 Да, белков 15000-70000 Да), получение которых описано в части 1 и фракции цитоплазматических и ядерных рибонуклеопептидных комплексов (с константой седиментации их во фракции в интервале 3,0-6,5 S (единиц Сведберга)), получение которых описано в части 2 в присутствии  $10^{-3}$  М в отношении (1:1) по объему, получая биорегуляторную композицию (биологически активную субстанцию) - высокоэффективный продукт, воздействующий на всех уровнях регуляции, как внутри ядра, внутри клетки в цитоплазме, так и в межклеточном пространстве.

Пример 5. Поддерживающее и восстанавливающее действие биорегуляторных композиций (биологически активной субстанции) из аорты, крови, быка, а также из листьев лещины на состояние артерий крысы.

Опыт проведен на экспериментальной модели роллерного органотипического культивирования фрагментов сосудов крысы *in vitro*. Были взяты фрагменты артерии размером около 5 мм длиной. Фрагменты сосудов промывали изнутри физиологическим раствором от остатков крови, далее помещали во флаконы с питательной средой 199, содержащей 10% эмбриональной телячьей сыворотки, а также антибиотик/антимикотик (Sigma) 1% и культивировали на роллере RM5 (Германия) в течение 7 суток при 37°C. Далее фрагменты сосудов фиксировали в фиксаторе Буэна и приготавливали стандартные парафиновые срезы толщиной 7 мкм, окрашенные гематоксилином и

эозином, и по Ван-Гизону. Для сравнения аналогично были приготовлены гистологические срезы фрагментов нативной артерии, взятые у крысы.

Данная модель органо-типического культивирования отражает собой дегенеративные процессы и изменения в определенных слоях сосуда (артерии), которые могут соответствовать состоянию сосудов при патологиях кровеносной системы, например, в результате ишемии или атеросклероза.

Описание гистологических препаратов

Нативная артерия

Внутренняя оболочка представлена хорошо выраженным слоем эндотелиальных клеток, лежащих на эластической мембране, далее представлена средняя оболочка, в которой наблюдали гадкую мускулатуру, эластические мембраны, между которыми находились сокращенные гладкомышечные клетки и фибробласты, а также эластин, коллаген и аморфное межклеточное вещество. Наружная соединительнотканная оболочка представлена в основном коллагеновыми и частично эластическими волокнами, а также фибробластами и жировыми клетками (Фиг. 1).

Роллерная органо-типическая культура артерии

При данном типе культивирования на 7 день наблюдается деградация внутренней оболочки артерий. Во внутренней оболочке артерии слой эндотелиальных клеток деградировал практически полностью, наблюдали гибель клеток. Деградация внутренней оболочки артерий, может быть аналогом атеросклеротического повреждения сосудов *in vivo*. Идет также накопление во внутренней оболочке недифференцированных гладкомышечных клеток, пролиферация которых в условиях *in vivo* также может приводить также к атеросклеротическим повреждениям. Наблюдали повышение содержания коллагена во внутренней и средней оболочке, что также может свидетельствовать об изменениях, аналогичных атеросклеротическим. Средняя оболочка представлена фибробластами и гладкомышечными клетками, среди которых отмечается значительное количество погибших клеток. Эластические волокна стали рыхлыми, они утратили свою конфигурацию в виде тяжей. Наружная оболочка также претерпела изменения, заключающиеся в нарушении организации коллагеновых и эластических волокон, а также в гибели части клеток (Фиг. 2).

Культивирование с добавлением биорегуляторной композиции, выделенной из крови, как описано в примере 1

При культивировании с биорегуляторной композицией из крови наблюдали во внутренней оболочке сосуда одиночные клетки эндотелия, хорошо выражена внутренняя эластическая мембрана (Фиг. 3). В отличие от контроля, не наблюдаем недифференцированных гладкомышечных клеток. В средней оболочке наблюдаем гадкую мускулатуру, эластические мембраны не сильно выражены, в основном наблюдали коллагеновые волокна и аморфное межклеточное вещество, между которыми находились в основном сокращенные жизнеспособные гладкомышечные клетки и фибробласты. В наружной оболочке видно нарушение организации коллагеновых и эластических волокон, а также гибель части клеток (Фиг. 3).

Культивирование с добавлением биорегуляторной композиции, выделенной из листьев лещины, как описано в примере 2

Во внутренней оболочке видны отдельные эндотелиальные клетки, хорошо выражена внутренняя эластическая мембрана (Фиг. 4). В средней оболочке наблюдали хорошо представленную гадкую мускулатуру, эластические мембраны, между которыми находились гладкомышечные клетки и фибробласты, а также коллагеновые волокна. В наружной оболочке хорошо выражены коллагеновые и эластические волокна, а

также фибробласты.

Культивирование с добавлением биорегуляторной композиции, полученной из аорты быка, как описано в примере 1

Внутренняя оболочка представлена хорошо выраженным слоем эндотелиальных  
5 клеток, лежащих на эластической мембране, незначительная деградация иногда  
наблюдалась (Фиг. 5). В средней оболочке наблюдали хорошо выраженную гладкую  
мускулатуру, эластические мембраны, между которыми находились сокращенные  
гладкомышечные клетки и фибробласты, а также эластин, коллаген и аморфное  
10 межклеточное вещество. Наружная соединительнотканная оболочка представлена в  
основном коллагеновыми и частично эластическими волокнами, а также фибробластами  
и жировыми клетками (Фиг. 5).

Биорегуляторная композиция из крови оказывала положительное влияние на  
поддержание гладкомышечных клеток и продукцией ими аморфного вещества.

Наиболее эффективным и выраженным действием на общее состояние сосудов  
15 оказала биорегуляторная композиция из аорты. После 7 дней культивирования стенка  
артерии выглядела наиболее приближенно к нативному состоянию с хорошо  
выраженными эластическими мембранами, а также гладкомышечными клетками и  
аморфным межклеточным веществом и хорошим эндотелиальным слоем. Также в  
хорошем состоянии находилась наружная мембрана артерии. Менее выраженным  
20 действием на состояние стенки артерии оказывала биорегуляторная композиция из  
листьев лещины. При его действии не сохранялся хорошо эндотелиальный слой, но  
хорошо были выражены эластические мембраны и гладкомышечные клетки с аморфным  
межклеточным веществом.

Исходя из вышеполученных результатов и анализа их данных можно рекомендовать  
25 биорегуляторные композиции из аорты и лещины, как наиболее эффективные для  
поддержания эластичности и прочности стенки сосудов, например при варикозном  
расширении вен, нарушении тонуса сосудов (гипертоническая болезнь или гипотония).  
Биорегуляторную композицию из аорты можно также рекомендовать при  
атеросклеротических изменениях в стенке артерий и при аневризмах.

30 Пример 6. Биологическое действие биорегуляторных композиций, полученных из  
сетчатки и пигментного эпителия глаза быка, на поддержание и восстановление этих  
тканей (способом, описанным в примере 1)

Исследования проводили на культуре заднего отдела глаза взрослых половозрелых  
тритонах *Pleurodeles waltl* обоих полов. Для эксперимента тритоны были  
35 наркотизированы в 2% растворе этилуретана на физиологическом растворе для амфибий  
(0,65% NaCl) или 0,1% растворе MS-222.

После наркотизации головы животных ополаскивали 70° этиловым спиртом и  
проводили энуклеацию глаз при стандартном лабораторном освещении. Изолированные  
глаза помещали в стерильные чашки Петри (3,5 см) в питательную среду для амфибий  
40 (среда 199 - 70%, вода дистиллированная - 30%).

С помощью бинокуляра, оснащенного источником холодного света, изолировали  
ткани глаз в следующей последовательности. Сначала освобождали глаз от кожных  
покровов, затем разрезали по окружности, проксимальнее лимба. Ростовую область  
сетчатки вместе с радужкой, роговицей и хрусталиком, которые отбрасывали. Задние  
45 секторы глаз, в состав каждого из которых входили сетчатка, пигментный эпителий,  
сосудистая оболочка и склера, использовали для последующего культивирования. В  
некоторых опытах сетчатку тоже удаляли и использовали для культивирования только  
пигментный эпителий с окружающими его оболочками.



Среда для выделения и культивирования тканей глаза содержала: 350 мл среды L-15 (в некоторых случаях заменяемой средой 199), 150 мл бидистиллированной дважды профильтрованной воды, 0,15 мл 1М буфера HEPES и 1 мл 4% сульфата гентамицина. При роллерном культивировании в среду добавляли 10% эмбриональной телячьей сыворотки. Среда культивирования перед внесением в пузырьки проходила холодную стерилизацию через мембранные фильтры типа "CA" фирмы Nalgene, (США) с размером пор 0,22 мкм. Полученные задние отделы глаз помещали на целлюлозные фильтры типа "A/E" фирмы Gelman, США, отмытые в 70° этаноле, и ополоснутые в культуральной среде. Во флаконы опытных серий добавляли исследуемые биорегуляторные композиции

объемом 0,1 мл в конечной концентрации  $10^{-8}$  и  $10^{-10}$  мг/мл. Во флаконы контрольных серий вместо биорегуляторных композиций добавляли 0,1 мл дистиллированной воды. Все флаконы закрывали стерильными крышками, затем пленкой ParafilmM, накрывали алюминиевой фольгой и ставили в термостат. Культивирование проводили в темноте при температуре 22°C в течение двух суток. Культуральную среду в течение этого времени не меняли.

При культивировании заднего отдела глаза морфология тканей (нейральная сетчатка, ПЭС, сосудистая и склеральная оболочки) сохранилась сходной с интактной. Склеральная оболочка имела хорошо выраженную волокнистую структуру - трехмерную сеть волокон с рассеянными фибробластами. Сосудистая оболочка имела сопоставимые с нормой толщину и уровень пигментации. В сетчатке наблюдали много апоптирующих клеток, происходило нарушение адгезии между ПЭ и сосудистой оболочкой сетчаткой, сетчаткой. Наблюдали изменение статуса дифференцировки клеток ПЭ, которое выражалось в смещении пигмента на апикальную сторону клеток монослоя, нарушению адгезии между ними и гибелью самих клеток. В склере деградировали коллагеновые волокна и образовывали пустоты и разрывы (Фиг. 7).

Однако при добавлении в среду культивирования биорегуляторной композиции из пигментного эпителия наблюдали уменьшение толщины сосудистой оболочки и увеличение уровня пигментации, что может свидетельствовать о сосудосуживающем действии данной композиции, а при добавлении биорегуляторной композиции из сетчатки наблюдали увеличение толщины сосудистой оболочки, что может говорить о сосудорасширяющем действии данной композиции (Фиг. 6).

При добавлении в среду культивирования биорегуляторной композиции из пигментного эпителия наблюдали увеличение концентрации пигментных гранул и их распределение в более базальной области клеток пигментного эпителия сетчатки. При культивировании не было отмечено выхода клеток пигментного эпителия из слоя или их миграции вглубь, во внутренние слои сетчатки, как это происходит в случае нарушения статуса клеточной дифференцировки данных клеток и их нестабильности. Гибель клеток сетчатки, выявляемая морфологически на полутонких срезах, была при этом значительной. Тела биполярных клеток были светло окрашены, имели хорошо различимые ядрышки; форма ядер сохранялась правильно округлой. Погибающие или погибшие биполяры имели ясные отличия от жизнеспособных (Фиг. 8). Клетки, входящие в апоптоз, содержали диспергированный плотно окрашенный хроматин на фоне светлых пространств ядер, а погибшие клетки - ядра меньших размеров с наиболее плотной окраской толудиновым синим. При действии биорегуляторных композиций из сетчатки и пигментного эпителия наблюдали поддержание жизнеспособности биполярных клеток примерно на 11% выше, чем в контроле. Гибель нейронов была выше в центральных областях сетчатки, чем на периферии, также гибель нейронов была выше в контрольных группах, чем в группах с добавлением в среду культивирования биорегуляторных

композиций из сетчатки и пигментного эпителия (Фиг. 9).

Также биорегуляторная композиция из пигментного эпителия поддерживала жизнеспособность Мюллеровских клеток, что видно из диаграмм, на которых отражено количество отростков Мюллеровской глии (Фиг. 10).

5 Таким образом, биорегуляторные композиции из тканей сетчатки и пигментного эпителия обладали протекторным действием на состояние самой нейральной сетчатки, слоя пигментного эпителия сетчатки и предотвращали нарушение адгезии тканей заднего отдела глаза. Исходя из этого, их можно использовать для поддержания

10 состояния различных тканей глаза и их клеточного состава при дегенеративных процессах в этих тканях.

Пример 7. Биологическое действие биорегуляторных композиций из крови и роговицы животных, например быка, на поддержание и восстановление ткани роговицы.

Эксперимент проводили на модели повреждения роговицы глаза кролика *in vivo*. Для проведения эксперимента кролики были разделены на следующие группы:

15 1-я группа - изучали действие биорегуляторной композиции, выделенной из крови;  
2-я группа - изучали действие биорегуляторной композиции, выделенной из роговицы глаза быка.

У каждого животного один глаз был опытным, в него закапывали изучаемую композицию; другой - контрольным, в него инсталлировали физиологический раствор.

20 Все препараты и физ. раствор инсталлировали в глаза дважды в сутки по 2 капли в каждый глаз в течение 21 дня.

Каждому животному для наркоза внутривенно вводили 0,5 мл Zoletic 50 и 0,3 мл Рометар 2%, 20 мг/мл, а также проводили эпibuльбарную анестезию роговицы раствором Инакоина (0,4% оксибупрокаин). Травму наносили трепаном диаметром

25 8,5 мм на глубину 0,8 мм делали надрез, затем пинцетом оттягивали край и расслаивали роговицу ножницами, подрезая ткань по кругу. Сразу после операции в опытные глаза инсталлировали по 2 капли изучаемые препараты, а в контрольные - по 2 капли физиологического раствора. Инсталляции проводили 2 раза в день.

Область повреждения роговицы оценивали в дальнейшем с помощью смачивания конъюнктивы кроликов бумажными индикаторами с флюоресцеином (область

30 повреждения окрашивается в зеленый цвет). Тест Ширмера - количество слезы, выделившейся за 60 секунд из глаза, измеряется с помощью специальной полоски, вставляемой под веко кролику (длина намокшей полоски, мм). В норме тест Ширмера для кролика составляет 7 мм. На 21-е сутки после травмы кроликов выводили из

35 эксперимента методом воздушной эмболии, роговицы выделяли для гистологических исследований, для этого их фиксировали в фиксаторах Буэна и 4%-ном формалине, заключали в парафин и делали срезы 7 мкм, которые окрашивали гематоксилин-эозином.

Во всех глазах, в которые инсталлировали физ. Раствор, на 10 сутки можно отметить бледно-розовую конъюнктиву, роговица была слабо прозрачная, отек роговицы

40 выражен. В некоторых случаях в центре раны наблюдали рубец высокой интенсивности, стромальный отек во внутренней части раны, перикорнеальную инъекцию сосудов, поверхностную васкуляризацию роговицы, участки корнеомалиции (гнойное разрушение роговицы) до 1,2 мм, окрашивание роговицы флуоресцеином было значительным (4,6-6,6 мм), наблюдали небольшое количество патологического эпителия. При инсталляции

45 физ. раствором на 21 день в роговицах можно отметить отслойку эпителия, местами его полное отсутствие (вследствие деградации), воспаление в строме под эпителием. В некоторых случаях наблюдали значительные количества клеток воспаления в строме (Фиг. 11). При применении биорегуляторной композиции, выделенной из крови, на 10

день отмечали стромальный отек роговицы, зрачок был сужен, в конъюнктиве выражена перикорнеальная инъекция сосудов, конъюнктивита воспалена. Место эрозии окрашивалось диффузно флуоресцеином материковой формы и имело размер 4,1-4,4 мм.

5 Наблюдали увеит, влага передней камеры была отечная, происходило начало эпителизации. На 21 день произошло небольшое утолщение роговицы, полная реэпителизация, много клеток воспаления в строме, происходила васкуляризация (Фиг. 11). При использовании биорегуляторных композиций роговицы на 21 день наблюдали небольшое воспаление стромы, эпителий хорошо развит, несмотря на нарушение его  
10 адгезии со стромой.

Полученные в этом исследовании результаты свидетельствуют о способности биорегуляторных композиций, выделенных из роговицы глаза и сыворотки крови быка, стимулировать ранозаживление роговицы у кроликов *in vivo*. Ранозаживляющее действие биорегуляторных композиций явно различается между собой. В случае применения  
15 биорегуляторной композиции, выделенной из крови, можно отметить развитие значительного воспаления в строме, хорошее состояние эпителия и его взаимодействие со стромой - отсутствие отслойки. Также отмечалась способность этой биорегуляторной композиции влиять на адгезионные взаимодействия клеток, особенно эндотелия роговицы. Биорегуляторная композиция роговицы оказывала более выраженное  
20 протекторное действие на состояние эпителия роговицы, а также предотвращала отек стромы, наблюдали лучшую картину состояния соединительнотканых волокон в строме.

Таким образом, было показано протекторное действие биорегуляторных композиций как биологически активной субстанции, на состояние роговицы кролика при  
25 моделированной глубокой травме роговицы

Пример 8. Исследование влияния биорегуляторной композиции из хрусталика на катарактогенез проводили на моделях культивирования хрусталиков глаз позвоночных животных, которые целыми культивировали в течение 8 суток *in vitro*. За этот период времени в хрусталиках, культивируемых в бессывороточной питательной среде без  
30 добавления повреждающих агентов, полностью сохранялась их прозрачность и морфология. Помутнение хрусталиков *in vitro* вызывали с помощью изменения концентрации ионов кальция в среде культивирования, или добавления в нее пероксида водорода. Были изучены культуры хрусталиков амфибий (*Rana temporaria* и *Xenopus laevis*) и млекопитающих (крыс и быков). Механизм повреждения пероксидом водорода, в  
35 основе которого лежит помутнение кортикальных слоев хрусталика, за счет активации перекисного окисления липидов в мембранах его волокон и клеток, наблюдается при осложненных, травматических и некоторых формах senile катаракт у человека. А механизм повреждения хлоридом кальция соответствует формированию ядерной катаракты за счет нарушения действия кальциевых АТФаз в волокнах хрусталика, что  
40 соответствует формированию ядерных катаракт у человека в результате ряда нарушений метаболизма. Таким образом, действие этих химических агентов приводит к образованию наиболее часто встречающихся форм катаракт в офтальмологической практике.

Были поставлены следующие серии опытов: №1 - питательная среда 199; №2 -  
45 питательная среда 199, содержащая  $H_2O_2$ ; №3 - питательная среда 199, содержащая  $H_2O_2$  + раствор, содержащий биорегуляторную композицию хрусталика; №4 - питательная среда 199, содержащая; №5 - питательная среда 199, содержащая + раствор содержащий биорегуляторную композицию хрусталика.

При индукции катарактогенеза пероксидом водорода у амфибий наблюдали помутнение кортикальных слоев, а ядро оставалось интактным (Фиг. 12). При добавлении в среду культивирования биорегуляторной композиции хрусталика наблюдали лишь легкое помутнение, ядерное помутнение отсутствовало (Фиг. 12). При индукции катарактогенеза хлоридом кальция у амфибий наблюдали помутнение ядра хрусталика, кортикальные слои оставались прозрачными, в отдельных случаях наблюдали образование легкого налета (Фиг. 13). В случае добавления исследуемой биорегуляторной композиции в среду культивирования не наблюдали ядерного помутнения хрусталиков (Фиг. 13).

При индукции катарактогенеза в хрусталиках быков, как в случае с хлоридом кальция, так и в случае с пероксидом водорода, возникало кортикальное помутнение средней степени на 3-4 сутки культивирования. При культивировании хрусталиков быков с повреждающими агентами и совместно с исследуемой биорегуляторной композицией из хрусталика глаз быков наблюдали незначительное помутнение кортикальных слоев (Фиг. 14, 15). При культивировании хрусталиков крыс с пероксидом водорода возникало помутнение ядра хрусталика и, в большей мере, кортикальных слоев, то есть развивалось тотальное помутнение (Фиг. 16). Хлорид кальция также вызывал тотальное помутнение хрусталиков крыс на этих же сроках культивирования (Фиг. 17.). При добавлении одновременно катарактогенных агентов - пероксида водорода и хлорида кальция в культуры хрусталиков крыс и биорегуляторной композиции из хрусталика быка в концентрации  $10^{-12}$  мг/мл наблюдали незначительное помутнение хрусталиков.

В серии №1 помутнения хрусталиков не наблюдали в течение всего периода культивирования. В сериях №2 и №4 (действие повреждающих агентов) на 3-4 сутки культивирования наблюдали образование тотального помутнения хрусталиков. В сериях №3 и №5 (совместное действие повреждающего агента и исследуемой биорегуляторной композиции хрусталика) наблюдали незначительное помутнение хрусталиков, в виде легкого флера. Биорегуляторную композицию хрусталика глаза быка, добавляли в среду культивирования в концентрации  $10^{-12}$  мг/мл.

Данные оценки степени помутнения хрусталиков в различных сериях, полученные с помощью визуального наблюдения, полностью совпадают с результатами спектрофотометрического исследования хрусталиков после их культивирования. Представленные на Фиг. 18 результаты свидетельствуют о том, что добавление в среду культивирования изучаемой биорегуляторной композиции способствует увеличению прозрачности хрусталиков приблизительно в два раза, по сравнению с хрусталиками, которые культивировали в среде, содержащей только катарактогенные агенты. Из полученных данных следует заключение, что биорегуляторная композиция хрусталика проявляет способность предотвращать развитие катарактогенеза не зависимо от механизма повреждающего воздействия. Кроме того, результаты этого исследования свидетельствуют об отсутствии видовой специфичности биологического действия изучаемой биорегуляторной композиции хрусталика глаза быка.

Пример 9. Исследование биорегуляторной композиции, выделенной из роговицы глаза быка, проводили на органной культуре роговиц глаза тритона *Pleurodeles waltl*.

Тритонов наркотизировали в 0.1%-ном растворе трикаин метансульфоната (MS-222), проводили энуклеацию глаз при стандартном лабораторном освещении. Изолированные глаза помещали в стерильные чашки Петри (3.5 см) в бессывороточную среду для амфибий (среда 199-70%, вода дистиллированная - 30%).

Под контролем бинокля производили прокол на латеральной поверхности глаза глазным скальпелем с пикообразным наконечником, в сделанный прокол вставляли

микрохирургические ножницы и вырезали роговицу по окружности. Для одной серии экспериментов роговицы вырезали без области лимба, для второй - вместе с ростовой зоной лимба. Культивирование роговиц тритона проводили в условиях: Среда для культивирования тканей глаза тритона состояла из 350 мл среды 199, 150 мл биодистиллированной кипяченой воды, 50 мл сыворотки плодов коров, 0.15 мл 1 М буфера Нерес и 1 мл 4%-ного раствора сульфата гентамицина. Роллерное культивирование роговиц проводили на роллере RM5 со скоростью вращения 35 об/мин во флаконах объемом 10 мл с темным стеклом ( $V_{\text{среды}}=4$  мл на одну роговицу) в темноте при температуре 22°C в течение 7 суток без смены среды. Роговицы фиксировали в растворе Буэна и обезвоживали. Гистологические препараты окрашивали гематоксилином и эозином. На микропрепаратах подсчитывали количество слоев эпителиальных клеток, а также, используя микрометрическую линейку, измеряли толщину эпителия и стромы, выражая их в % по отношению к общей толщине роговицы (т.н. относительная толщина).

В настоящем исследовании было изучено биологическое действие биорегуляторной композиции роговицы в концентрации  $10^{-11}$  мг/мл.

Определение таких параметров, как относительная толщина эпителия роговицы и количество слоев клеток в нем позволяет характеризовать изменение общего количества клеток эпителия в зависимости от условий культивирования. Относительная толщина стромы (в сравнении с интактной роговицей) позволяет оценить изменение уровня ее гидратации в условиях культивирования. Возрастание величины этого параметра свидетельствует об увеличении гидратации стромы, что является негативным процессом, связанным с нарушением барьерной функции эндотелия роговицы.

Извлеченные из культуральной среды роговицы представляли собой сферообразные структуры, за счет изгибания и сближения краев роговицы. Роговицы как в опыте, так и в контроле состояли из трех слоев. В контроле в роговице можно было выделить эпителий, строму и эндотелий, лишь по краю роговицы происходила незначительная миграция эпителиальных клеток на внутреннюю поверхность роговицы в виде монослоя (Фиг. 19). Эти клетки постепенно замещали эндотелиальный слой на периферии роговицы таким образом, что внутренняя ее поверхность после культивирования оказывалась покрытой двумя типами клеток: эндотелиальными в центральной части и эпителиальными на периферии (среднее число клеточных слоев эпителия здесь составило  $1.8 \pm 0.4$ ).

В опыте процесс замещения эндотелия эпителиальными клетками к концу культивирования был полностью завершен (Фиг. 19). В роговицах можно было выделить три сформированных слоя - наружный эпителиальный (исходный), строму и внутренний эпителиальный (вновь образованный). Относительная толщина слоев роговицы и количество слоев эпителиальных клеток приведены в табл. 1. Относительная толщина наружного эпителиального слоя в опыте была достоверно выше, чем в контроле ( $p < 0.05$ ). Эти данные указывают на стимуляцию под действием регуляторной композиции роговицы глаза быка пролиферации эпителиальных клеток в роговицах тритонов с сохраненной областью лимба при данном способе культивирования.

Были обнаружены достоверные отличия в относительной толщине стромы между опытом и контролем - в опыте толщина стромы была в среднем в 1.3 раза меньше, чем в контроле. При воздействии биорегуляторной композиции роговицы как при сохранении области лимба, так и без данной области относительная толщина стромы была достоверно меньше ( $p < 0.05$ ), чем в соответствующих контролях и достоверно не отличалась от данного параметра для интактной роговицы ( $p > 0.05$ ). Эти результаты

можно объяснить тем, что биорегуляторная композиция роговицы быка способствует поддержанию структуры роговицы тритона, что препятствует гидратации стромы.

Таким образом, биорегуляторная композиция роговицы быка стимулирует процессы пролиферации и миграции клеток, относящихся к области лимба, то есть стволовые клетки эпителия роговицы. Только в том случае, если роговицы, выделенные с областью лимба, подвергались воздействию биорегуляторной композиции роговицы быка, образовывался полностью сформированный внутренний дополнительный слой клеток эпителия. Это свидетельствует о том, что источником образования этого дополнительного слоя являются клетки лимба, испытывавшие стимулирующее воздействие биорегуляторной композиции роговицы быка. При этом общее количество эпителиальных клеток на наружной и внутренней поверхностях роговицы в опыте значительно превышало эту величину для контрольных культур. Показателем этого является достоверно ( $p < 0.05$ ) различающееся количество слоев клеток в обоих эпителиальных слоях роговицы в опыте и контроле.

Таблица 1. Влияние биорегуляторной композиции роговицы быка на состояние роговицы тритона при роллерном культивировании

| Измеряемый параметр роговицы                                        | Интактная роговица | Культивирование с областью лимба |            | Культивирование без области лимба |             |
|---------------------------------------------------------------------|--------------------|----------------------------------|------------|-----------------------------------|-------------|
|                                                                     |                    | опыт                             | контроль   | опыт                              | контроль    |
| относительная толщина наружного эпителиального слоя, %              | 31.3 ± 1.3         | 35.4 ± 3.2*                      | 28.9 ± 3.9 | 36.0 ± 5.5                        | 8.8 ± 2.6*  |
| относительная толщина наружного эпителиального слоя, %              | 31.3 ± 1.3         | 35.4 ± 3.2*                      | 28.9 ± 3.9 | 36.0 ± 5.5                        | 8.8 ± 2.6*  |
|                                                                     |                    | P < 0.05                         |            | P < 0.05                          |             |
| относительная толщина стромы, %                                     | 63.9 ± 2.2         | 53.0 ± 3.6                       | 73.1 ± 4.4 | 63.2 ± 2.4                        | 94.2 ± 2.8* |
|                                                                     |                    | P < 0.05                         |            | P < 0.05                          |             |
| относительная толщина внутреннего эпителиального слоя (в центре), % | —                  | 4.8 ± 1.4*                       | —          | —                                 | —           |
| количество слоев клеток эпителия                                    | 3.6 ± 0.5          | 5.3 ± 0.6*                       | 4.4 ± 1.6* | 3.8 ± 0.4                         | 1.5 ± 0.4*  |
|                                                                     |                    | p > 0.05                         |            | p < 0.05                          |             |

Примечание. \* Достоверное отличие от параметров интактной роговицы ( $p < 0.05$ ).

"—" данного слоя нет в эксперименте.

Пример 10. Протекторное действие исследуемой биорегуляторной композиции из семенников крыс в концентрации ( $10^{-14}$  мг/мл) изучали на модели органного роллерного

культивирования семенников мышей. Использовали роллер RM5 (Assistant, Германия) со скоростью вращения 35 об/мин. Семенники мыши целиком помещали во флаконы с культуральной средой 199, содержащей 10% эмбриональной телячьей сыворотки и 1% антибиотик/антимикотик (Sigma). В контрольные флаконы ничего не добавляли, а в опытные добавляли биорегуляторную композицию, выделенную из семенников крыс. Культивирование проводили при 37°C в течение 4-х суток. Далее исследовали гистологию семенников и семенных канальцев с помощью световой микроскопии.

В контрольных культурах, после 4-х дней культивирования наблюдали процессы деградации интерстиции семенных канальцев, разрушения внеклеточного матрикса и гематотестикулярного барьера, а также выраженную гибель клеток и сперматозоидов. В опыте наблюдали протекторное действие биорегуляторной композиции из семенников, которое выражалось в поддержании структуры канальцев, адгезионных взаимодействий между канальцами, предотвращении деградации интерстиции. Кроме того, поддерживалась жизнеспособность и дифференцировка клеток, включая сперматозоиды в семенных канальцах (Фиг. 20).

Пример 11. Модель индуцированного панкреонекроза у крыс.

Исследование проводили на крысах Wistar, самки, весом 230-250 г. Наркоз (Золетил 100) вводили внутримышечно. Проведена брюшинная лапаротомия (разрез примерно 2 см), перед этим брюхо крысы выбрито и обработано йодом. Из брюшной полости за желудок вытащена поджелудочная железа, на ней выбрано место с меньшим количеством сосудов, приложена крышка с отверстием в диаметре 1 мм в отверстие налита ледяная уксусная кислота (5 мкл), время аппликации 15 секунд, место язвы промокали фильтровальной бумагой, органы убирали в брюшную полость, зашивали место разреза, обрабатывали антисептиком. Через 2,5 часа после окончания операции всем группам животных давали питье и корм. В эксперименте по панкреонекрозу животных разделили на 3 группы по 5 голов в каждой: (1) контроль, получавший только воду; (2) с панкреонекрозом, опосредованным аппликацией ледяной уксусной кислотой; (3) с панкреонекрозом и биорегуляторной композицией поджелудочной железы быка в концентрации  $10^{-7}$  мг/мл. Животные принимали водный раствор биорегуляторной композиции поджелудочной железы в поилках на протяжении 10 дней, после чего их выводили из эксперимента. Образцы тканей фиксировали в 10% растворе нейтрального формалина, окрашивали по стандартной методике гематоксилином-эозином и исследовали микроскопически. В контрольной группе при развитии панкреонекроза у крыс в области повреждения ацинарная ткань заменяется на жировую и соединительнотканную, островки Лангерганса частично деградируют и замещаются соединительной тканью и фибробластами, выводные протоки более увеличены в просвете, стенки протока расслаиваются и истончаются (Фиг. 21). На границе ацинарной и некротической ткани присутствуют клетки воспаления. Междольковые протоки больше наполнены секретом. В опытной группе, в которой животные принимали раствор биорегуляторной композиции поджелудочной железы быка, на фоне развития панкреонекроза, площадь жировой ткани меньше, а соотношение ацинарной ткани к жировой на единицу площади выше, чем в контрольной группе в 2,5-3 раза (Фиг. 21). Жировая ткань в опыте расположена вплотную к некротическим бляшкам, а в контроле эти типы тканей разделены толстым слоем соединительной ткани. В контроле в двенадцатиперстной кишке происходит расслаивание ткани подслизистой основы на границе с мышечной пластиной. Значительные изменения в состоянии двенадцатиперстной кишки отмечаются при воздействии биорегуляторной композиции поджелудочной железы. Собственная пластинка слизистой двенадцатиперстной кишки

сохраняется, ворсинки более широкие, толщина подслизистой и серозной оболочки больше, в них меньше дегенерация клеток, чем в контроле (Фиг. 22). Особенно важно отметить протекторное действие биорегуляторной композиции поджелудочной железы, при развитии острого панкреонекроза в данном эксперименте на состояние почек. На гистологических срезах почек видны некротические изменения клубочков в контрольной группе (Фиг. 23). В опытной группе, почечные клубочки лишь незначительно отекали, но клетки жизнеспособные (Фиг. 23).

Таким образом, биорегуляторная композиция из поджелудочной железы обладает поддерживающим действием на состояние поджелудочной железы, двенадцатиперстной кишки и почек при остром панкреонекрозе и может быть использована при различных панкреатитах.

Пример 12. Исследование специфической активности биорегуляторных композиций на модели органного культивирования яичников.

Исследование проводили на крысах линии Wistar. Яичники были вырезаны и целиком помещены во флаконы с культуральной средой 199, содержащей 10% эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС) («HyClone», США) и 1% антибиотика/антимикотика («Sigma», Германия) объемом 6 мл. Перед культивированием питательную среду стерилизовали пропусканием через мембранные фильтры GV с диаметром пор 0.22 мкм («Millipore», США). Во флаконы опытной серии добавляли изучаемую биорегуляторную композицию яичников в концентрации  $10^{-9}$  мг белка/мл; биорегуляторную композицию крови в концентрации  $10^{-12}$  мг/мл; биорегуляторную композицию семенников в концентрации  $10^{-9}$  мг/мл; во флаконы с образцами контрольной группы не добавляли ничего.

Культивирование проводили при 37°C в течение 5 суток. Использовали роллер RM5 («Assistant») со скоростью вращения 35 об/мин.

После завершения культивирования яичники опытной и контрольной групп фиксировали в растворе Буэна, затем делали парафиновые срезы и окрашивали их гематоксилином и эозином. Изучение полученных гистологических образцов, подсчет числа фолликулов на срезах и фотофиксацию изображений проводили с помощью микроскопа Olympus (VANOX, АНВТЗ, Япония) и цифровой камеры Olympus (U-PMTVC, Япония). Подсчитывали среднее количество фолликулов жизнеспособных и погибших в опыте, контроле и интактной ткани.

Данные приведены на Фиг. 24. Полученные результаты (число жизнеспособных фолликулов в контрольной, нативной и опытных группах) являются статистически достоверными ( $p < 0,05$ ).

Показано, что наибольшее количество жизнеспособных фолликулов наблюдали в яичниках, которые культивировали с добавлением биорегуляторных композиций из семенников и яичников крупного рогатого скота. (Фиг. 24, 25).

Пример 13. Исследование состояния биорегуляторной композиции из склеры исследовали на модели культивирования заднего отдела глаза как описано в примере 6, в течение 10 суток. При длительном культивировании тканей заднего отдела глаза взрослых особей позвоночных животных на фильтрах *in vitro* во всех тканях можно наблюдать развитие деструктивных явлений, в частности, в склере, которые характерны для ряда патологий у человека. В настоящем исследовании на 10 сутки в контрольных культурах наблюдали картину начала развития дегенеративных процессов во всех тканях заднего отдела глаза. Следует отметить, что среди первых идентифицируются нарушения адгезивных межклеточных взаимодействий. В контроле наблюдали картину нарушения адгезивных связей между клетками и внеклеточным веществом и между



самими волокнами в склере, а также между склерой и сосудистой оболочкой. Внутри склеры наблюдали полости между волокнами коллагена, что говорит о деградации коллагеновых волокон. В сетчатке, сосудистой оболочке и ПЭ наблюдается картина полной деградации клеток, пигмент в пигментных клетках мигрировал на апикальную сторону и сбрасывался, что говорит о дестабилизации статуса дифференцировки этих клеток. Фиг. 26.

Добавление в среду культивирования биорегуляторной композиции из склеры в концентрации  $10^{-9}$  мг/мл способствовало сохранению пространственной организации заднего отдела глаза: улучшению взаимодействия между сосудистой и склеральной оболочками. Слой пигментного эпителия сетчатки также находился в лучшем состоянии по сравнению с контролем: пигмент распределен равномерно в клетках, между клетками сохраняются адгезивные взаимодействия, что говорит о стабилизации статуса клеточной дифференцировки данного типа клеток. В склере наблюдали более компактное и плотное расположение волокон, с менее заметными расслоениями, чем в контроле. Фибробласты в склере также выглядели более жизнеспособными, судя по морфологии их ядер. Фиг. 27. Подсчет фибробластов на единицу площади склеры в культивированных задних отделах глаза показал, что фибробластов было больше приблизительно в два раза при добавлении в среду культивирования биорегуляторной композиции склеры, чем в культурах контрольной группы (контроль  $25,32 \pm 0,63$ , опыт  $52,01 \pm 0,69$ ;  $p < 0,05$ ).

Таким образом, полученные данные указывают на способность исследуемой биорегуляторной композиции из склеры поддерживать адгезивные взаимодействия между склерой и прилежащими тканями, а также препятствовать развитию дегенеративных процессов в склеральной оболочке. Отмеченное выраженное влияние данной биорегуляторной композиции на состояние склеры, сосудистой оболочки и пигментного эпителия дает основание для прогноза использования этой композиции в качестве основы препарата, применяемого при глазных патологиях, в основе которых лежит нарушение функции этих тканей.

Биорегуляторную композицию из склеры также исследовали на моделях роллерного культивирования тканей глаза *in vitro*, в условиях культивирования как отдельно изолированной склеры, так и культивировании целого глаза *in vitro*.

При роллерном культивировании отдельных фрагментов склеры наблюдали ее деструкцию как в опыте, так и в контроле. При этом, происходило выселение или гибель клеточных элементов из ткани. Состояние самой склеральной оболочки было лучше при добавлении в среду культивирования биорегуляторной композиции склеры, поскольку сохранялась целостность и компактность коллагеновых волокон в отличие от контрольного культивирования без добавления композиции, где наблюдали расслоение волокон и нарушение их компактности, Фиг. 28.

При культивировании целого глаза наблюдали примерно одинаковую картину, как в случае его культивирования с биорегуляторной композицией склеры, так и без нее. Было показано, что в течение всего срока культивирования сохранялась пространственная организация тканей, но наблюдали гибель основных типов клеток в сетчатке. Склера и сосудистая оболочка оставались практически без изменений, а у роговицы погибали клетки эпителиального пласта. В культурах опытной серии можно отметить сохранение адгезионных взаимодействий между тканями заднего сектора (Фиг. 29). В склере наблюдали присутствие жизнеспособных фибробластов (контроль  $3,45 \pm 0,31$ ; опыт  $17,23 \pm 0,51$ ;  $p < 0,05$ ) и более плотную, упорядоченную организацию коллагеновых волокон.

Полученные данные показывают, что на модели органотипического культивирования

склеры в составе заднего отдела глаза, а также на модели роллерного культивирования изолированной склеры и целого глаза тритона Pl. waltl удалось выявить протекторное действие исследуемой биорегуляторной композиции склеры, которое выражалось в увеличении жизнеспособности фибробластов склеры, поддержании пространственной организации коллагеновых волокон в ткани склеры. Кроме того, была продемонстрирована способность биорегуляторной композиции склеры поддерживать статус клеточной дифференцировки в ПЭ и адгезию между тканями заднего отдела глаза.

Пример 14. Ранозаживление кожи у мышей под действием биорегуляторных композиций из крови, листьев подорожника и алоэ

Эксперимент по исследованию ранозаживления кожи проводили на мышах-гибридах F1, самцы, весом 20-22 г. У мышей, наркотизированных эфиром, на спине выщипывали шерсть и вырезали лоскут кожи диаметром около 1 см. Исследования кожных ран проводили на 11-ые сутки после травмы на поперечных гистологических срезах толщиной 7 мкм. Срезы окрашивали гематоксилин-эозином.

Животных разделяли на 5 групп. 1-я (контрольная) группа - рана заживала первичным натяжением; 2-я (контрольная) группа - в рану ежедневно наносили физиологический раствор. В опытных группах раны ежедневно обрабатывали растворами биорегуляторной композиции, выделенной соответственно из алоэ древовидного (группа 3) подорожника большого (группа 4), крови (группа 5), Растворы изучаемых биорегуляторных композиции исследовали в дозах  $10^{-11}$ - $10^{-14}$  мг белка/мл.

На Фиг. 30 представлены микрофотографии гистологических срезов интактной кожи мыши, а также срезов кожи мышей всех экспериментальных групп.

На 11-е сутки после нанесения раны, у животных всех групп наблюдали практически полную реэпителизацию, небольшое воспаление в субэпидермальной зоне. У мышей 1-й контрольной группы (необработанная рана) образовывался фиброзный рубец с плотными тяжами коллагеновых волокон, происходила эпителизация, струп отходил от эпителия. В дерме образовался фиброзный рубец, видны незначительные очаги воспаления Фиг. 30. При обработке раны физиологическим раствором также наблюдали формирование соединительнотканного рубца, но из-за хронического очага воспаления в области травмы не происходило полной реэпителизации, не формировалась подкожная жировая ткань, в дерме наблюдали очаг воспаления и множество сосудов Фиг. 30. Гистологическое исследование показало, что у мышей 1-й и 2-й контрольных групп наблюдали развитие воспалительного процесса, неполную эпителизацию области раны, отмечалось нарушение адгезионных взаимодействий между эпителием и дермой, не происходило восстановления протоков желез, в дерме образовывалась рубцовая ткань. Совершенно иная картина наблюдалась при воздействии биорегуляторных композиций, выделенных из листьев подорожника и алоэ - растений с можно наблюдать восстановление нормальной структуры кожи с полной реэпителизацией, с сильно разросшейся подкожной жировой тканью и восстановлением в ней протоков потовых желез, а также полным отсутствием воспаления в дерме Фиг. 30. При воздействии биорегуляторной композиции крови происходила интенсивная эпителизация раны, полное отслоение струпа, в дерме отсутствовали очаги воспаления, в подкожной жировой ткани можно было наблюдать формирование протоков желез и мышечных элементов наблюдали сильное стягивание краев раны и практически полную ее реэпителизацию, более выраженную, чем у животных обеих контрольных групп, отслойки эпителия практически не наблюдали. Структура дермы почти восстановлена, отмечали отсутствие очагов воспаления. В подкожной ткани происходило

восстановление многочисленных протоков желез, а в дерме - волосяных фолликулов. Жировая ткань сильно развита. Полученные данные указывают на исключительно высокую эффективность изучаемой композиции в заживлении кожных ран у млекопитающих *in vivo*. Препарат не только стимулировал регенерацию в кожной ране, но и способствовал формированию в области травмы морфологически полностью восстановленной ткани (Фиг. 30). В результате проведенных исследований установлено, что биорегуляторные композиции из крови, подорожника и алоэ активно участвуют в процессе регенерации ран кожи у млекопитающих *in vivo*; при их воздействии происходит практически полное восстановление морфологической структуры поврежденной ткани кожи; они могут быть использованы для предотвращения образования рубцовой ткани и заживления ран кожи.

Пример 15. Поддержание и восстановление кости у крыс

Исследование было проведено на самцах крыс Wistar, весом 180-220 г. Всем животным под наркозом в один день проводили операцию по нанесению стандартного дефекта в дистальном эпифизе бедра (2×2 мм), в контрольной группе в костные дефекты ничего не вносили; в опытную группу вводили биорегуляторную композицию из крови в концентрации  $10^{-12}$  мг/мл.

Животные были выведены из эксперимента на 14-е и 30-е сутки. Фрагменты бедренных костей, содержащие дефекты с захватом окружающих здоровых тканей на расстоянии 2-3 мм от дефекта, фиксировали в 4%-ном растворе параформальдегида. Далее их отмывали в проточной воде и сушили на воздухе. Ионное напыление золота на образцы осуществляли на приборе Sputter Coater SCD-005 (BAL-TEC, США), приготовленные препараты исследовали на растровом электронном микроскопе LEO 1430VP (Carl Zeiss, Германия).

На 14-е сутки во всех группах экспериментальных животных наблюдали образование сохранение сетчатой структуры, обширных участков соединительной ткани, расстояния между Гаверсовыми каналами были небольшими. В контроле наблюдали обширные участки костномозговой ткани, на границе дефекта начиналось образование костного матрикса. К 30-м суткам контрольные дефекты зарастали неупорядоченной костной тканью с содержанием большого количества каверн различного размера (Фиг. 31). В опыте с добавлением биорегуляторной композиции расстояния между Гаверсовыми каналами увеличивались. Через 14 дней после операции отмечалось заполнение свободного пространства в полости дефекта регенерирующей костной тканью. Через месяц после внесения композиции отмечалось полное зарастание полости дефекта, Каверны в нем не обнаруживались. На 30-ые сутки во всех группах наблюдали также сохранение обширных участков, представленных соединительной тканью и сетчатой структурой. В контроле расстояния между Гаверсовыми каналами продолжали оставаться небольшими, костный дефект был заполнен клеточно-волокнуистой соединительной тканью (ретикулофиброзная костная ткань), формировалась губчатая кость. В опытной группе наблюдали обширные участки костномозговой ткани, кроме того участки, представленные соединительной тканью, резко уменьшены, а расстояния между Гаверсовыми каналами увеличены Фиг. 31.

Из полученных данных можно заключить, что уже на 14-е сутки эксперимента наблюдались признаки различной степени выраженности костеобразовательной активности. На 30 сутки происходило замещение костных дефектов новообразованной костной тканью. Особо следует указать на довольно раннее появление признаков репаративного остеогенеза, что свидетельствует о довольно высокой остеопотентности биорегуляторной композиции крови.

Результаты экспериментов *in vivo* показали, что восстановление дефектов в полной мере наступало только у животных, которым давали биорегуляторную композицию из крови, поскольку в зоне повреждения через 30 сут не обнаруживались пустоты. Результаты настоящей работы позволяют сделать вывод о том, что исследуемая биорегуляторная композиция может быть использована для индукции пролиферативного потенциала клеток, а также в качестве самостоятельного агента при восстановлении костных дефектов.

Пример 16. Исследование биорегуляторной композиции крови на модели экспериментальной язвы желудка у крыс

Экспериментальную язву желудка создавали по методу Okabe в модификации на крысах Wistar, самках, массой 200-250 г. Перед операцией крыс наркотизировали инъекцией внутримышечно в бедро 147 мкл Zoletil-100. После наркоза, сбривали шерсть на брюшной стороне, обрабатывали кожу йодом, делали послойные разрезы, доставали желудок через разрез и осторожно размещали в операционной ране на влажной марлевой салфетке. Экспериментальную язву желудка воспроизводили путем наложения на серозную оболочку фундальной части желудка в области тела или дна пластикового кольца диаметром 0,5 см, во внутреннее пространство которого вносили 30 мкл ледяной уксусной кислоты, вызывая химический ожог, приводящий к образованию хронической язвы желудка в этом месте. Место для аппликации выбирали вне крупных сосудов; время аппликации 30 сек. Затем смывали физиологическим раствором остатки уксусной кислоты, зашивали послойно мышцы брюшины и кожу. Обработывали швы аэрозолем тетрациклина (окситетрациклина гидрохлорид).

В контрольной группе животные с язвой, получали в поилках воду; в опытной группе животные с язвой, получали биорегуляторную композицию крови в концентрации  $10^{-10}$  мг/мл в виде водного питьевого раствора ежедневно.

На 5-е, 10-е сутки после нанесения язвы животных выводили из эксперимента эфирным наркозом, перед этим они не получали корм 12 часов.

Оценку состояния язвы проводили визуально путем измерения ее площади (индекс язвы в  $\text{мм}^2$ ), а также морфологически по результатам гистологического анализа. Образцы ткани фиксировали 10%-ным нейтральным формалином, заливали в парафин, готовили гистологические срезы, которые окрашивали гематоксилин-эозином, а также по Маллори для выявления коллагеновых волокон и альциановым синим для выявления кислых мукополисахаридов.

5-й день эксперимента

Визуальное описание области язвы. На 5-й день после операции в группе (у), получавшей р-р биорегуляторной композиции сыворотки крови индекс язвы составил  $15,1 \text{ мм}^2$ , в то время, как в контрольной группе -  $31,4 \text{ мм}^2$ .

На 5-й день после операции наблюдали отечность вокруг язвы желудка у всех животных, а также в области язвы спайки брыжейки и печени с желудком. Через все слои стенки желудка проходил некроз. Наблюдали сильное воспаление и расширение просвета 12-перстной кишки. Крысы опытной группы были более активны. Наблюдали спайку сальника и печени с желудком в области язвы. Диафрагма была гиперемирована. В отличие от контрольных крыс, в опытной группе брыжейка и сальник легко отделялись от желудка, сальник закрывал язву и был плотной резиновой консистенции. 12-перстная кишка имела меньший диаметр, чем у крыс контрольной группы, что говорит о снятии воспаления. Отечность вокруг язвы не выражена.

При сравнении с интактными животными и животными опытной группы у крыс

контрольной группы эпителиальный слой слизистой желудка выглядел тоньше примерно в 1,5-2 раза. У животных опытной группы наблюдали меньшую степень деградации тканей в области язвы желудка, отсутствие явлений стаза, меньшую интенсивность воспаления, а также более выраженную сохранность структур желудка в области язвы.

5 Следует отметить, что у животных опытной группы сохранялась мышечная пластинка слизистой в краях язвы, в отличие от крыс контрольной группы, у которых она деградировала (Фиг. 32).

У всех животных с язвой в подслизистой желудка было отмечено развитие фибриноидного некроза, который способствует укреплению стенки желудка в месте дефекта, предотвращая прободение язвы. В контрольной группе можно наблюдать

10 неплотные тяжи коллагеновых волокон в подслизистой и мышечной пластинке слизистой, в то время как у крыс опытной группы коллагеновые волокна образовывали более плотные тяжи. При окраске альциановым синим у крыс опытной группы было обнаружено большее количество гликозаминогликанов в эпителиальных клетках и

15 слизистой области края язвы, чем у животных контрольной группы и, кроме того, у них наблюдали интенсивную продукцию слизи, выстилающей дно язвы, что является защитным механизмом от воздействия желудочного сока.

Кроме состояния слизистой оболочки желудка исследовали состояние слизистой оболочки двенадцатиперстной кишки. У животных контрольной группы

20 двенадцатиперстная кишка была расширена, содержимое желтоватого цвета с резким запахом, наблюдался отек по сравнению с опытной группой. Состояние слизистой оболочки у животных этой группы также существенно отличалось, чем у животных контрольной группы: крипты больше в два раза, отсутствовали признаки воспаления и отека. Окраска альциановым синим подтвердила существенно лучшее состояние

25 двенадцатиперстной кишки у животных опытной группы: было отмечено нормальное функционирование клеток цилиндрического эпителия, продуцирующих кислые гликозамингликаны в просвет кишки. В отличие от животных этой группы, у крыс контрольной группы было снижено количество слизи в клетках двенадцатиперстной кишки.

Таким образом, было показано, что на пятые сутки эксперимента биорегуляторная композиция, выделенная из крови, способствует поддержанию толщины эпителия слизистой в желудке и двенадцатиперстной кишке. Состояние тканей этих органов соответствует нативному. Кроме того, прием биорегуляторной композиции из крови способствует увеличению секреции кислых гликозамингликанов в желудке и

30 двенадцатиперстной кишке.

#### 10-й день эксперимента

Макроскопическое исследование. У крыс контрольной группы отмечали наличие спаек брыжейки и печени с желудком в области язвы, у животных края язвенного дефекта гиперемизированы, отечны, формирующийся в месте повреждения рубец

40 деформирован, отделение спаек затруднено. У крыс опытной группы отмечали плоские края язвы, отек в области язвы отсутствовал, нет гиперемии близлежащих сосудов. Происходило образование спаек брыжейки и печени с желудком в области язвы, которые легко разделялись. На 10-й день эксперимента у животных обеих групп происходило стягивание язвенного дефекта грануляционной тканью с образованием зоны

45 фибриноидного некроза (Фиг. 33). У животных опытной группы в подслизистой оболочке отмечалось плотное прилегание волокон коллагена, в то время как у животных контрольной группы - их расслоение. В опытной группе у крыс в зоне язвенного дефекта коллагеновые волокна значительно более толстые, чем у животных контрольной

группы, у которых язвенный дефект был закрыт неплотной соединительной тканью.

Различия в синтезе кислых гликозамингликанов у животных опытной группы и контрольной группы, обнаруженные на 5-й день, сохранились и на 10-й день эксперимента (Фиг. 34). У животных опытной группы выработка кислых гликозамингликанов в эпителии желудка и двенадцатиперстной кишке приближалась к их секреции в нативных тканях; на краю язвы также сохранилась интенсивная выработка слизи с покрытием дна язвы. Следует отметить, что секреция слизи (мукополисахаридов) необходима для защиты слизистой желудка от воздействия соляной кислоты и ферментов. У крыс в контрольной группе по-прежнему наблюдали деградацию эпителия, дуоденит, отек и увеличение просвета двенадцатиперстной кишки.

Важно, что у животных опытной группы сохраняется мышечная пластинка слизистой в краях язвы в отличие от контрольной группы, у которых она деградирует.

Помимо состояния оболочек желудка исследовали состояние слизистой оболочки двенадцатиперстной кишки.

У животных контрольной группы наблюдают сильное воспаление и расширение двенадцатиперстной кишки. Содержимое кишки было желтоватого цвета с резким запахом, имел место отек, воспаление, происходило разрушение слизистой оболочки кишки и деградация крипт. У животных опытной группы состояние слизистой оболочки двенадцатиперстной кишки соответствует нативной ткани. Окраска альциановым синим также подтверждает хорошее состояние слизистой оболочки в опытной группе.

Таким образом, на десятые сутки эксперимента, биорегуляторная композиция, выделенная из крови быка, оказывала выраженное протекторное действие на состояние тканей желудка и двенадцатиперстной кишки. В области экспериментальной язвы при применении данной композиции происходила более быстрая и качественная репарация дефекта.

Таким образом, биорегуляторная композиция, выделенная из крови, способствовала ускоренному рубцеванию язвенных дефектов слизистой желудка с активным образованием кровеносных сосудов и сохранением мышечной пластинки слизистой оболочки в области рубца, эффективной секрецией мукополисахаридов, защищающей стенку желудка от воздействия желудочного сока. В эксперименте с биорегуляторной композицией наблюдали защиту двенадцатиперстной кишки при отсутствии сопутствующего дуоденита, сохранность слизистой оболочки, а также поддержание ее нормальной функции.

Пример 17. Исследование действие биорегуляторных композиций из мозга и крови на модели геморрагического инсульта у крыс

Исследование действия хронического введения проводилось на белых беспородных крысах, самцах, 2,5 мес, около 190 г.

1. контрольная группа с моделью гемморагического инсульта

2. опытная группа с моделью гемморагического инсульта и пероральным

применением биорегуляторной композиции крови

3. опытная группа с моделью гемморагического инсульта и интраназальным введением биорегуляторной композиции из мозга

4. опытная группа с моделью гемморагического инсульта и интраназальным введением биорегуляторной композиции из мозга и пероральным введением

биорегуляторной композиции из крови

5. опытная группа с индуцированным геморрагическим инсультом и введением препарата сравнения Мексидол.

Интраназальный путь введения для биорегуляторной композиции из мозга был

выбран, как способ доставки в мозг наиболее эффективный. Доставка веществ этим путем рассматривается как современная альтернатива пероральному приему, поскольку назальная полость легкодоступна, имеет много капилляров, имеет большую площадь поверхности и хорошо проницаема, что способствует увеличению биодоступности и хорошей всасываемости. Кроме того, препараты попадают в кровоток напрямую, без прохождения через печень. В качестве препарата сравнения был выбран отечественный синтетический препарат Мексидол, препарат, для которого ранее были представлено антиоксидантное и мембранопротективное действие. Эффективность Мексидола была выявлена на нейрональном и сосудистом уровнях. Эффективная доза составляет 100 мг/кг. В данном эксперименте животным вводили по 20 мкл в носовой проход, при каждом введении биорегуляторной композиции из мозга. Биорегуляторную композицию из крови использовали в виде ежедневного перорального приема в дозе  $10^{-11}$  мг/мл. Препарат сравнения Мексидол применяли готовый (ООО «НПК» ФАРМАСОФТ», 50 мг/мл) по 0,5 мл на крысу в виде инъекций. Контрольным животным вводили физиологический раствор путем интраназального введения.

Получение модели геморрагического инсульта у крыс

Геморрагический инсульт сопровождается генерализованным повышением тонуса сосудов мозга и значительным снижением уровня кровоснабжения мозга. Поэтому необходимо восстановление сосудов и мозгового кровообращения при данной патологии. Интрацеребральную геморрагию воспроизводили у наркотизированных крыс по А.Н. Макаренко и соавторов (2002). В качестве общей анестезии использовали уретан (1,3 г/кг, внутривенно). Зубным бором высверливали симметричные отверстия слева и справа в проекции внутренней капсулы: Н=4 мм, L=3 мм, А=-1,5 мм от брегмы). Потом прокалывали твердую мозговую оболочку с помощью заточенной иглы-канюли и погружали ее с помощью стереотаксического прибора до требуемой глубины (4 мм). Затем мандрен-нож выдвигали до упора, который обеспечивается верхним фиксатором, и производили три поворота влево и вправо, тем самым подсекая сосуды. Следующий этап: мандрен-нож извлекается, а в иглу-канюлю через 2-3 мин гамильтоновским шприцем вводят аутокровь 0,15 мл в область механической деструкции мозговой ткани. В большинстве случаев кровь распределяется в виде хорошо очерченной гематомы у конца инъекционной иглы с деформацией и разрушением подкорковых структур в области ядер таламуса, реже - в подкорковом белом веществе. Кровоток определяли в ипсилатеральном полушарии в 3 мм от повреждения и в контралатеральном полушарии - в точке, симметричной повреждению. После операции рану обеззараживали и зашивали, крыс помещали в клетки и наблюдали их состояние и процесс заживления в течение 2 недель.

Введение препаратов было начато в день операции, через 1 час.

Оценка микроциркуляции в коре головного мозга крыс с помощью лазерного доплеровского флоуметра

Для оценки состояния микроциркуляции проводили регистрацию локального мозгового кровотока в теменной области коры головного мозга крыс с помощью лазерного доплеровского флоуметра ALF-21 фирмы "TransonicSystemInc." (США). Для этой цели игольчатый датчик флоуметра диаметром 0,8 мм устанавливали на теменной области коры головного мозга на расстоянии 6-7 мм дистальнее основания средней мозговой артерии по направлению ее центральной ветви с помощью микроманипулятора и коромысла. Суть метода заключается в том, что монохроматический пучок света малой интенсивности, излучаемый лазерным диодом, встроенным в доплеровский лазерный флоуметр, проходит по гибкому световоду и

через наконечник датчика освещает исследуемую ткань. В ткани свет рассеивается отражающими частичками. Часть света отражается обратно и по приемному световоду попадает на внутренний фотоприемник аппарата. В соответствии с эффектом Допплера, только движущиеся частицы (главным образом эритроциты) приводят к частотному сдвигу. Спектр принятого сигнала обрабатывается в аппарате в соответствии с алгоритмом, полученным Боннером для такого типа отражения, и рассчитывается объем потока (мл/мин/100 г ткани). Таким образом, в основе метода лежит измерение доплеровской компоненты в спектре отраженного лазерного сигнала, рассеянного на движущихся в микрососудах форменных элементах крови. Для регистрации состояния микроциркуляции (локального мозгового кровотока) крыс закрепляли в стереотаксисе и в теменной кости бором просверливали отверстие диаметром 1,5 мм до поверхности твердой мозговой оболочки, которая сохранялась интактной. Микроциркуляцию регистрировали с помощью лазерного доплеровского флоуметра ALF-21 фирмы «TransonicSystemsInc.» (США). Для этой цели игольчатый датчик флоуметра диаметром 0,8 мм устанавливали на теменной области коры головного мозга с помощью микроманипулятора и коромысла. Одновременно у экспериментальных животных регистрировали изменения уровня артериального давления в бедренной артерии через полиэтиленовый катетер. Запись показателей кровотока и артериального давления производили на полиграфе фирмы ВЮРАС (США), соединенным с персональным компьютером.

Проведенные опыты показали, что геморрагическое поражение мозга вызывает значительное понижение уровня мозгового кровотока в коре большого мозга крыс в зоне повреждения в ипсилатеральном полушарии и в контралатеральном полушарии в зоне, симметричной повреждению. Исходный уровень локального мозгового кровотока снижался сразу же после геморрагического повреждения мозга и через 30 минут был ниже исходного на 47% и 60%. Следует отметить, что при геморрагическом поражении мозга снижение локального мозгового кровотока в большинстве опытов наблюдалось в течение 1,5-2 часов наблюдения и к концу эксперимента составляло -50% и -70%. Геморрагическое поражение мозга сопровождалось понижением уровня артериального давления на 16 и 22% к концу эксперимента.

На данной модели было показано, что биорегуляторная композиция из крови увеличивала кровоток в коре головного мозга наркотизированных крыс в условиях модели геморрагического инсульта, вызывая при этом снижение уровня артериального давления. Биорегуляторная композиция из мозга при интраназальном введении понижала локальный мозговой кровоток в области мозга крыс на фоне разнонаправленного влияния на артериальное давление. При комбинированном введении биорегуляторных композиций из крови и мозга наблюдали увеличение кровотока в коре мозга крыс в условиях модели геморрагического инсульта без существенных изменений артериального давления. После совместного введения биорегуляторных композиций из крови и мозга наркотизированным крысам в условиях модели «геморрагического инсульта» локальный мозговой кровоток увеличивался на 45%. Артериальное давление сначала увеличивалось на 10% потом снижалось до фонового. Препарат сравнения мексидол у крыс в условиях геморрагического поражения мозга увеличивает кровоток в коре мозга крыс на фоне развивающейся гипотензии.

Тесты для выявления влияния действия исследуемых препаратов на течение геморрагического инсульта в динамике при хроническом введении

Для оценки неврологического статуса на 1,3 и 7 дни использовали метод оценки неврологического дефицита по шкале оценки инсульта (Stroke-index) McGrow. Тяжесть



состояния оценивали по сумме соответствующих баллов по шкале Stroke-index McGrow.

Еженедельно проводили следующие тесты:

а) Тест "Удержание на горизонтальной перекладине" для оценки тяжести угнетения моторных функций, координации движения и терапевтических эффектов биорегуляторных композиций (биологически активной субстанции). Тест использовали для регистрации неврологического дефицита, выражающегося в нарушении координации движений и равновесия. Крыс помещали на горизонтальный стержень диаметром 2 см длиной 30 см и расположенный на расстоянии 50 см над полом. Оценивалась способность животных удерживать равновесие на стержне в течение 2 мин (время удержания до падения в сек).

б) Тест "Удержание на вертикальной сетке"

Проводили для регистрации мышечного тонуса и оценки влияния на физическую работоспособность крыс в условиях статической нагрузки. В условиях эксперимента использовали жестко закрепленную вертикально-ориентированную сетку шириной 40 см и высотой 100 см, ограниченную со всех сторон деревянными бортами. В экспериментальных условиях данная процедура обеспечивает равномерное распределение нагрузки на все группы мышц, в особенности на мускулатуру конечностей. Преимущества данного метода состоит в том, что достаточно большая высота установки способствует тому, что животное самостоятельно контролирует уровень физической нагрузки и перестает удерживать тело только при появлении усталости (перемещается на нижнюю горизонтальную поверхность). Разовое тестирование состоит из 5-ти предъявлений (цикл): экспериментатор возвращает животное на вертикальную сетку сразу после того, как оно перемещается на горизонтальную поверхность 4 раза. Фиксировалось суммарное время «висения» на сетке. Критерием эффективности препаратов является достоверное увеличение суммарного времени выполнения теста в условиях статической физической нагрузки после введения препарата по сравнению с контролем и эталонным препаратом.

в) Тест "Открытое поле" для получения данных о двигательной и исследовательской активности.

Тест «Открытое поле» применяли для оценки возможных последствий хронического введения препаратов на двигательную и исследовательскую активность экспериментальных животных в условиях свободного поведения. Этот тест также характеризует эмоциональное состояние животного. Тест проводили по стандартной методике. В течение 2 минут регистрировали следующие параметры: горизонтальная активность, количество выходов в центр "открытого поля", количество стоек, количество актов груминга, количество дефекаций.

г) Тест «Установка для экстраполяционного избавления» проводили для изучения когнитивных функций грызунов в условиях острого стресса.

Тест применяли для оценки влияния активных веществ на нарушение когнитивных функций в условиях острой стрессорной ситуации, вызванное моделью геморрагического инсульта.

Результаты теста "Удержание на горизонтальной перекладине" для оценки тяжести угнетения моторных функций, координации движения и эффектов биорегуляторных композиций

Тест проводили для регистрации неврологического дефицита, выражающегося в нарушении координации движений, до введения препаратов (фоновое значение) и 1 раз в неделю на протяжении всего периода введения - 4-х недель. Неспособность животных удерживать равновесие на стержне в течение 2 минут рассматривалось как проявление

нарушения координации движений. Оценивали время удержания на перекладине в секундах. Необходимо отметить, что в первую неделю после операции у контрольных групп, как ложнооперированных животных, так и с моделью геморрагического инсульта, координация движений была нарушена значительно больше по сравнению с фоновым значением для этих животных - на 40-55%, соответственно, что вероятно можно объяснить стрессовым состоянием животных в результате операций и каждодневных манипуляций. В то же время, через две и три недели после операции показатели выполнения теста у группы животных с моделью геморрагического инсульта (негативный контроль) оставались наиболее низкими, что может служить косвенным подтверждением развития геморрагического инсульта. К концу четвертой недели разница в способности выполнять тест у животных контрольных групп исчезла, что может свидетельствовать о восстановлении функций ЦНС после оперативного вмешательства. Наибольшая эффективность при хроническом введении исследуемых биорегуляторных композиций была выявлена у биорегуляторной композиции из крови в течение всего периода введения. Значимые отличия средних результатов выполнения теста для группы животных получавших данную композицию от группы негативного контроля геморрагического инсульта были выявлены на первой неделе введения препарата, при этом значение среднего времени удержания на перекладине вдвое превысило значение негативного контроля и достигло фонового значения. Эффект сохранялся до конца периода введения - в течение 4-х недель. Важно отметить, что действие данной биорегуляторной композиции приводило к большему или сопоставимому эффекту в данном тесте по сравнению с Мексидолом в течение всего периода исследования. Эффективность применения биорегуляторной композиции из мозга была обнаружена в значительно меньшей степени. Наиболее значимое отличие от негативного контроля геморрагического (48%) было выявлено к концу второй недели введения, с последующим снижением эффективности. При комбинированном введении двух биорегуляторных композиций также было обнаружено улучшение способности животных выполнять тест на второй и третьей неделе исследования, по сравнению с негативным контролем, при этом значимое отличие результатов этой группы животных было выявлено через две недели применения композиций.

#### Результаты проведения теста «Удержание на вертикальной сетке»

Данный тест использовали для регистрации мышечного тонуса и оценки влияния на физическую работоспособность крыс в условиях статической нагрузки. В условиях эксперимента использовали жестко закрепленную вертикально-ориентированную сетку шириной 40 см и высотой 100 см, ограниченную со всех сторон деревянными бортами. В экспериментальных условиях данная процедура обеспечивает равномерное распределение нагрузки на все группы мышц, в особенности на мускулатуру конечностей. Преимущества данного метода состоит в том, что достаточно большая высота установки способствует тому, что животное самостоятельно контролирует уровень физической нагрузки и перестает удерживать тело только при появлении усталости (перемещается на нижнюю горизонтальную поверхность). Разовое тестирование состоит из 5-ти предъявлений (цикл): экспериментатор возвращает животное на вертикальную сетку сразу после того, как оно перемещается на горизонтальную поверхность 4 раза. Фиксировалось суммарное время «висения» на сетке. Критерием эффективности препаратов является достоверное увеличение суммарного времени выполнения теста в условиях статической физической нагрузки после введения препарата по сравнению с контролем и эталонным препаратом. Интраназальное введение биорегуляторной композиции из мозга привело к

достоверному увеличению как среднего времени удержания за 5 подходов, так и максимального времени за подход на  $55 \pm 25\%$  и  $100 \pm 32\%$ , соответственно, в течение всего периода введения препарата, что свидетельствует о повышении выносливости и улучшении мышечного тонуса животных при интраназальном введении биорегуляторной композиции из мозга. Совместное использование биорегуляторных композиций из крови и из мозга в течение одной недели способствовало увеличению значений исследуемых параметров (суммарного и максимального времени выполнения теста на 45 и 65%, соответственно) по сравнению с контролем геморрагического инсульта. Применение препарата сравнения Мексидол практически не оказывало никакого влияния на способность животных выполнять тест. Проведение теста «Открытое поле» показало увеличение горизонтальной и вертикальной активности (двигательная и исследовательская активность) у животных получавших совместно биорегуляторные композиции из крови и из мозга в течение всего периода исследования, но без влияния на уровень их тревожности. В группе получающей Мексидол, начиная со второй недели имеется тенденция к увеличению тревожности, что выражается в уменьшении горизонтальной и вертикальной активности, актов груминга. Таким образом можно сделать заключение, что биорегуляторные композиции из крови и из мозга оказывают влияние на координацию движений, исследовательскую активность (когнитивные функции животных), мозговое кровообращение.

#### Пример 18. Исследование биорегуляторных композиций на модели Болезни Паркинсона у крыс

Для введения исследуемых препаратов был выбран интраназальный путь введения, как неинвазивный, удобный и эффективный способ доставки препаратов в мозг. Известно, что высокая эффективность интраназального введения дофамина была подтверждена экспериментально на крысах линии Wistar с моделью, индуцированной 6-гидроксидофамином (6-OHDA). В качестве препарата сравнения был выбран 3,4-дигидроксифенилаланин (L-DOPA, Sigma) в сочетании с ингибитором периферического декарбоксилирования, препятствующим превращению препарата в дофамин в периферических тканях (бенсеразид, Sigma) в соотношении 1:4, что воспроизводит стандартный препарат для лечения болезни Паркинсона, применяемый в терапии для снижения выраженных симптомов заболевания. Препарат устраняет гипокинезию, ригидность, тремор. Действие L-DOPA обусловлено превращением в дофамин непосредственно в ЦНС, что приводит к восполнению дефицита дофамина в ЦНС. Терапевтический эффект у человека отмечается через 6-8 дней, а максимальный - через 25-30 сут. Препарат сравнения L-DOPA в концентрации 3,0 мг/мл готовили еженедельно, непосредственно перед началом эксперимента. В качестве растворителя использовали физиологический раствор с добавлением аскорбиновой кислоты (1%, pH 2.6) для улучшения растворимости и предотвращения окисления препарата при растворении. Для оптимального растворения L-DOPA pH раствора снижали до 1.5 и после растворения препаратов значение pH повышали до значения не выше 7.0. Раствор хранили при  $+4^\circ\text{C}$  в течение недели, прекращая использование при появлении желтоватого оттенка раствора, свидетельствующего об окислении действующего вещества. Концентрация ингибитора бенсеразида составила 0,75 мг/мл. В данном эксперименте животным вводили максимально возможную дозу, учитывая путь введения, минимальный объем введения и низкую растворимость субстанции L-DOPA. Все препараты вводили животным в носовые проходы. Объем отдельного однократного введения составлял до 40,0 мкл.

Получение модели Болезни Паркинсона у крыс и подтверждение ее развития

В эксперименте была использована фармакологическая модель болезни Паркинсона с использованием нейротоксина 6-OHDA (6-гидроксидофамин, Sigma) для разрушения компактной части черной субстанции. Токсин вводили односторонне, в правую часть мозга, при помощи стереотаксической установки для крыс по стандартной методике, по координатам AP -4,4; L -1,2; H 7,8, что соответствует правому медиальному переднемозговому пучку. Операцию проводили под общим наркозом. Крысам внутрибрюшинно вводили раствор хлоралгидрата (Chloralhydrat, ALDRICH) в дозе 400 мг/кг, 100 мг/мл в физиологическом растворе (Нижфарм). Зафиксировав животное, сверлили отверстие в черепе по выбранным координатам, затем вводили иглу канюли, 10 заполненной раствором 6-OHDA в дегазованном физрастворе (4 мкг/мкл), или, в случае животных из группы интактного контроля, дегазованным физраствором. При помощи мерного шприца на 10 мкл вводили 4,5 мкл раствора со скоростью 1 мкл/мин. После введения иглу оставляли в отверстии еще на 5 минут. После операции рану обеззараживали и зашивали, крыс помещали в клетки и наблюдали их состояние и 15 процесс заживления в течение 2 недель.

Тесты для подтверждения развития модели болезни Паркинсона

а) "Вращение, вызванное введением апоморфина", для доказательства развития болезни Паркинсона

Развитие нейродегенерации подтверждали через 3 недели после операции регистрацией 20 вращения в ответ на внутрибрюшинное введение раствора апоморфина (R-(-)-Apmorphinehydrochloridehemihydrate, Sigma) 1,6 мг/кг (0,8 мг/мл, в физрастворе). Через 10 минут после инъекции крысу помещали в стеклянный цилиндр радиусом 30 см и высотой 40 см. В течение последующих 10 минут регистрировали количество полных оборотов, совершенных крысой в каждую сторону. По количеству оборотов в минуту 25 в сторону, противоположную стороне повреждения мозга судили о степени нейродегенерации у животных. Для участия в дальнейшем эксперименте отбирали животных, совершавших более 2 оборотов/мин.

б) "Открытое поле" для получения предварительных данных о двигательной и исследовательской активности

30 Тест «Открытое поле» применяли для оценки возможных последствий хронического введения препаратов на двигательную и исследовательскую активность экспериментальных животных в условиях свободного поведения. Тест проводили по стандартной методике. В течение 2 минут регистрировали следующие параметры: горизонтальная активность, количество выходов в центр "открытого поля", количество 35 стоек, количество актов груминга.

в) "Постановка конечности" для оценки тяжести угнетения моторных функций

Тест «Постановка конечности» использовали для оценки координации движений животных с односторонне разрушенной черной субстанцией. Животное держали одной 40 рукой под живот, параллельно краю лабораторного стола, ниже его поверхности. Затем медленно поднимали таким образом, чтобы вибриссы касались края стола, а в конечной точке подъема передняя лапа соответствующей стороны тела была выше края столешницы. Критерием выполнения попытки считали постановку передней конечности ближней к столу стороны тела на поверхность стола.

Испытание повторяли 10 раз для каждой стороны, занося в протокол количество 45 успешных попыток.

Тесты для выявления влияния исследуемых препаратов на течение болезни Паркинсона в динамике

Еженедельно:

Тест "Постановка конечности" для оценки тяжести угнетения моторных функций и эффективности лечения

Тест использовали для оценки координации движений животных с односторонне разрушенной черной субстанцией. Животное держали одной рукой под живот, параллельно краю лабораторного стола, ниже его поверхности. Затем медленно поднимали таким образом, чтобы вибриссы касались края стола, а в конечной точке подъема передняя лапа соответствующей стороны тела была выше края столешницы. Критерием выполнения попытки считали постановку передней конечности ближней к столу стороны тела на поверхность стола. Испытание повторяли 10 раз для каждой стороны, занося в протокол количество успешных попыток. Тест проводится дважды, за 30 мин до и через 30 мин после введения очередной дозы препарата для оценки длительности эффекта.

Разовые тесты (интервал между проведениями не менее месяца):

а) "Открытое поле" для получения данных по двигательной и исследовательской активности, общему состоянию животных, депрессивности

Тест «Открытое поле» применяли для оценки возможных последствий хронического введения препаратов на двигательную и исследовательскую активность экспериментальных животных в условиях свободного поведения. Тест проводили по стандартной методике. Поведение крыс исследовали в «открытом поле» в соответствии с общепринятыми стандартами. «Открытое поле» - квадратная равномерно освещенная площадка размером 80×80 см, огороженная непрозрачными стенками высотой 15 см. Пол «открытого поля» расчерчен на квадраты со стороной 20 см. Исходно животное помещается в центр поля, после чего экспериментатор фиксирует поведенческую активность в течение 5-ти минут. В течение 2 минут регистрировали следующие параметры: горизонтальная активность, количество выходов в центр "открытого поля", количество стоек, количество актов груминга.

б) Передвижение по горизонтальной сетке с видеофиксацией, для оценки тяжести угнетения моторных функций и эффективности лечения

Тест «Передвижение по горизонтальной сетке» использовали, чтобы выявить асимметрию в координации движений конечностей, вызванную односторонней деградацией черной субстанции. Установка представляла приподнятый над поверхностью стола на 40 см квадратный каркас 40×40 см с натянутой поверх металлической сеткой. Сторона ячейки составляла 2,5 см. Животное помещали на установку и регистрировали его передвижения на видеокамеру в течение 2-х минут. Последующий анализ видеозаписи включал в себя подсчет общего количества шагов каждой из передних конечностей за 2 минуты, а также общее количество «ошибок» - промахов в постановке, когда передняя конечность не находит опоры и проваливается ниже уровня сетки.

Тест «Постановка конечности», острое введение

Тест проводили через 30 минут после первого введения препаратов. За 100% результата принимали средний результат в группе здорового контроля. Результаты остальных групп составили: в группе негативного контроля -  $60 \pm 17\%$ , у группы, получавшей препарат сравнения -  $87 \pm 17\%$ , у группы, получавшей биорегуляторную композицию крови -  $57 \pm 25\%$ , у группы, получавшей биорегуляторную композицию из мозга -  $69 \pm 18\%$ , у группы, получавшей обе композиции -  $72 \pm 18\%$ . Было зафиксировано достоверное отличие средних результатов теста для группы, получавшей L-DOPA/бенсеразид по сравнению с группой негативного контроля ( $p < 0,05$ ).

Тест «Постановка конечности», субхроническое введение

Тест проводили 1 раз в неделю, на протяжении всего периода введения - 4-х недель. Тестирование животных проводили непосредственно перед введением препаратов и через 30 минут после введения. Тестирование животных в таком режиме при хроническом введении позволило выявить эффективность действия препарата непосредственно после введения и изучить действие препаратов через сутки после введения. Результаты теста оценивали через 30 минут после введения препаратов в динамике. Важно отметить, что препарат сравнения L-DOPA обнаруживает эффективность действия через 30 мин после введения на протяжении всего периода исследования. В то же время, достоверно значимые отличия от группы негативного контроля были получены только лишь при остром применении.

1 неделя введения. Выявлена достоверная эффективность применения комбинации биорегуляторных композиций. Необходимо отметить, что результат был обнаружен только через 30 мин после очередного введения препарата и отсутствовал через 24 часа после введения. Эффект препарата сравнения, показанный при остром введении, не был выявлен через неделю после начала терапии, что можно объяснить «эффектом истощения дозы» для L-DOPA.

3 недели введения. Тестирование животных с моделью болезни Паркинсона после трех недель введения препаратов выявило достоверное улучшение результатов выполнения теста для группы, получавшей биорегуляторную композицию из мозга - результаты группы через 30 мин после очередного введения препарата составили  $89 \pm 22\%$  от результатов здорового контроля, в то время как результат группы негативного контроля -  $51 \pm 35\%$ . Важно отметить, что достоверные различия с результатами негативного контроля были зафиксированы также и при проведении теста непосредственно перед очередным введением препарата, то есть эффект терапии сохраняется не менее чем 24 часа после введения. Результат при тестировании до введения препарата составил для группы, получавшей биорегуляторную композицию из мозга,  $84 \pm 20\%$  от результата группы здорового контроля.

4 недели введения. Проведение тестирования через четыре недели введения препаратов подтвердило достоверное улучшение результатов группы, получавшей биорегуляторную композицию из мозга - результат группы через 30 мин после очередного введения препарата составили  $89 \pm 22\%$  от результата здорового контроля и достоверно отличался от группы контроля Болезни Паркинсона (Фиг 35). При субхроническом введении выявлена эффективность исследуемой биорегуляторной композиции из мозга в течение всего периода введения. Достоверные отличия средних результатов выполнения теста для группы животных получавших данную композицию от группы негативного контроля индуцированной болезни Паркинсона были выявлены к концу третьей недели введения препарата, при этом значение среднего результата достигло  $89 \pm 22\%$ , с сохранением эффекта до конца периода введения - в течение 2-х недель. Эффективность применения исследуемой биорегуляторной композиции из крови была обнаружена в меньшей степени, без достижения достоверно значимых результатов. При комбинированном введении двух исследуемых биорегуляторных композиций было обнаружено улучшение способности животных выполнять тест в течение всего периода исследования, по сравнению с негативным контролем, при этом достоверное отличие результатов этой группы животных было выявлено через неделю применения. К концу периода введения препаратов у всех групп животных получавших исследуемые препараты, при тестировании через 30 мин после введения, обнаружено улучшение способности выполнять тест в большей степени по сравнению с группой животных, получающих препарат сравнения. Средние значения составили  $75 \pm 25\%$ ,  $*89 \pm 22\%$ ,

72±19% и 64±22%, соответственно, для групп получавших биорегуляторную композицию крови, биорегуляторную композицию мозга, комбинацию биорегуляторных композиций из мозга и крови и препарата сравнения, в то время как такая способность выполнять тест у животных группы негативного контроля снизилась до 45% (Фиг. 35).

5 Таким образом, выявлена способность биорегуляторной композиции из мозга улучшать моторные функции животных, что отражается в увеличении эффективности выполнения теста «Постановка конечности» через 4 недели введения через 30 мин после введения с сохранением эффекта через 24 часа. Для групп животных получавших биорегуляторную композицию из крови и комбинацию биорегуляторных композиций  
10 из крови и мозга к концу периода введения препаратов (4 недели) также было отмечено сохранение большей эффективности при выполнении теста до введения новой дозы по сравнению с группой животных, получавших препарат сравнения. Что, несомненно, свидетельствует о положительном действии исследуемых препаратов.

Результаты проведения теста «Передвижение по горизонтальной сетке»

15 Тест производился однократно, через три недели введения препаратов через 30 мин после введения препаратов. Регистрировалось количество шагов каждой передней конечностью и количество ошибок при их постановке. На основе этих данных рассчитывался коэффициент асимметрии:  $K(\text{асимметрии}) = K(\text{ошибок левой}) - K(\text{ошибок правой})$ . Обнаружено, что животные с индуцированной односторонней моделью БП  
20 (повреждена черная субстанция в правой части мозга) хуже контролируют движения левой передней конечности. У животных группы здорового контроля коэффициент асимметрии практически равен нулю, в то время как у животных негативного контроля в среднем равен 5%. По результатам данного теста, все исследуемые препараты эффективно устраняли симптомы болезни Паркинсона. Результаты трех групп,  
25 животных получавших исследуемые биорегуляторные композиции по отдельности и в сочетании достоверно отличались как от результата группы негативного контроля, так и от результата группы получавшей препарат сравнения (Фиг 36). При этом, у результатов групп, получавших исследуемые биорегуляторные композиции, не было достоверных различий с результатами группы здорового контроля  $p < 0,05$ .

30 Полученные результаты теста «Передвижение по горизонтальной сетке» полностью согласуются с результатами, полученными в тесте «Постановка конечности» и подтверждают как наличие моторных дисфункций у животных с индуцированной болезнью Паркинсона, так и значимо более высокую эффективность назальной терапии биорегуляторными композициями по сравнению со стандартным  
35 противопаркинсоническим препаратом. Препарат сравнения достоверно улучшал моторные функции животных только при однократном применении. В то же время, эффект от ежедневного назального введения, выявляемый в тесте «постановка конечности» через 30 мин после введения, был замечен в течение всего периода введения и отличался на 10-20% от значений группы контроля Болезни Паркинсона. Важно  
40 отметить, что действие препарата сравнения не сохранялось при тестировании животных через 24 часа после введения. Полученные результаты согласуются с литературными данными, а также известными характеристиками препарата, как быстро метаболизирующегося и проявляющего эффект в одной дозе короткое время, что требует постоянного увеличения дозы и кратности приема препарата у человека.  
45 Выявлена эффективность исследуемой биорегуляторной композиции из мозга при субхроническом введении в тесте «Постановка конечности». Достоверные отличия средних результатов выполнения теста через 30 мин после введения для группы животных получавших данную композицию от группы негативного контроля Болезни

Паркинсона были выявлены к концу третьей недели введения препарата, при этом значение среднего результата достигло  $89 \pm 22\%$  от группы здорового контроля, с сохранением эффекта до конца периода введения - в течение 2-х недель. Важно отметить достоверное сохранение действия препарата и через 24 часа после введения, что свидетельствует о стабильном улучшении моторных функций у животных как минимум в течение недели, с конца третьей и до конца четвертой недели введения. Введение биорегуляторных композиций из мозга и крови, а также их комбинированного применения привело к полному восстановлению координации животных в тесте «Передвижение по горизонтальной сетке». Полученные результаты имели достоверное отличие от группы контроля Болезни Паркинсона и группы получавшей препарат сравнения ( $p < 0,05$ ) и не имели достоверных отличий от результатов группы здорового контроля.

Таким образом биорегуляторные композиции из мозга и крови оказывали эффект на модели Болезни Паркинсона у крыс на восстановление двигательной активности и нормализация работы ЦНС при нейродегенеративных заболеваниях, что выражалось в улучшении координации движений и ориентации в пространстве.

Пример 19. Исследование действия биорегуляторных композиций, полученных как указано в примерах 1 и 2 на реакцию гиперчувствительности замедленного типа

Цель эксперимента: выявить действие биорегуляторных композиций на реакцию гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ) после сенсibilизации, то есть восстанавливающий иммунитет эффект.

#### Методика

Использовали мышей в каждой группе по 8 шт (самки, 14-16 г.) линии BALB/c:

№1 (контроль 1), №2 (контроль ГЗТ), №3 Биорегуляторная композиция подорожника, №4 Биорегуляторная композиция алоэ, №5 Биорегуляторная композиция крови, №6 биорегуляторная композиция из тимуса (мозговое вещество), №7 биорегуляторная композиция тимуса (корковое вещество), №8 биорегуляторная композиция костного мозга, №9 биорегуляторная композиция селезенки.

1 день Сенсibilизация KLH (гемоцианин из лимфы улитки, Sigma, Немосанин от Megathura crenulata)

Группы №1-№9. Каждая из этих групп была сенсibilизирована подкожной инъекцией между лопаток 100 мкг KLH (в 0,1 М PBS pH 7,4), растворенном в ПАФ в соотношении 1:1, в объеме 200 мкл/мышь.

13 день Иммунизация Препаратом, в/брюшинно введение препаратов в объеме 200 мкл на PBS 0,1 М (группы №3-№5). в/брюшинно введение PBS 0,1 М 200 мкл (группа №1).

Разрешающая инъекция KLH. На 14-й день после сенсibilизации

Группы №2-№9. Каждая группа получила внутрикожную инъекцию 20 мкг/мышь KLH в 0,1 М PBS pH 7,4 в правую заднюю лапу, в объеме 50 мкл. В левую лапу вводят внутрикожно 50 мкл PBS. Группа №1 получила внутрикожную инъекцию 50 мкл 0,1 М PBS pH 7,4 в правую заднюю лапу. В левую лапу вводят внутрикожно 50 мкл PBS.

Через 24 ч после разрешающей инъекции KLH, ГЗТ ответ проявлялся увеличением правой лапы, был измерен параметр набухания лапы, отражающий разницу в сумме толщины и ширины правой и левой лап (М), в различные временные точки после разрешающей инъекции (24, 48 ч), с помощью шкалы микрометра МК-25. В данном исследовании исследовали иммуномодулирующее действие некоторых биорегуляторных композиций на модели гиперчувствительности замедленного типа на линии мышей BALB/c.



Полученные данные свидетельствуют о том, что только биорегуляторная композиция крови статистически достоверно увеличивала реакцию ГЗТ примерно в два раза в течение первых суток после разрешающей инъекции. Биорегуляторная композиция, выделенная из алоэ, имела выраженную тенденцию к повышению реакции ГЗТ (примерно в 1,5 раза), статистически достоверно не отличающуюся от контрольной группы. Биорегуляторные композиции из тимуса (мозговое вещество) и селезенки имели тенденцию к понижению реакции ГЗТ (примерно в 2 раза), а биорегуляторная композиция из костного мозга выраженную тенденцию к снижению реакции ГЗТ (примерно в 2 раза), но статистически достоверно не отличающуюся от контрольной группы. Биорегуляторная композиция из тимуса (корковое вещество) также статистически (удалить) достоверно снижала реакцию ГЗТ в 3 раза, по сравнению с контрольной реакцией ГЗТ в данной серии опытов. Таким образом, на фоне введения всех исследуемых биорегуляторных композиций, кроме биорегуляторной композиции крови и тимуса (корковое вещество), после реакции сенсибилизации не происходило достоверного изменения реакции ГЗТ. Увеличение реакции ГЗТ под действием биорегуляторной композиции крови может быть обусловлено активацией эффекторных Т клеток (в основном клеток Th1). (Табл. 2, Фиг 37).

**Таблица 2. Данные по реакции гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ) через 24 часа после разрешающей инъекции.**

| № группы                                                   | M±m (мм)    |
|------------------------------------------------------------|-------------|
| 1 (контроль1)                                              | -0,15±0,05* |
| 2 (ГЗТ)                                                    | 0,46±0,08   |
| 3 (биорегуляторная композиция из подорожника)              | 0,47±0,12   |
| 4 (биорегуляторная композиция из алоэ)                     | 0,73±0,19   |
| 5 (биорегуляторная композиция крови)                       | 0,99±0,11*  |
| 6 биорегуляторная композиция из тимуса (мозговое вещество) | 0,35±0,08   |
| 7 биорегуляторная композиция из тимуса (корковое вещество) | 0,14±0,08*  |

|                                                           |                  |
|-----------------------------------------------------------|------------------|
| <p>8 биорегуляторная композиция</p> <p>костного мозга</p> | <p>0,24±0,1</p>  |
| <p>9 биорегуляторная композиция</p> <p>селезенки</p>      | <p>0,36±0,08</p> |

\* - звездочкой помечены данные, достоверно отличающиеся от группы 2 с реакцией ГЗТ ( $p < 0,05$ ).

М (средняя разница суммы правой и левой лап у мышей в группе)  
m (стандартное отклонение от среднего).

Группы №2-№9. Каждая группа получила внутрикожную инъекцию 20 мкг/мышь KLH в 0,1 М PBS pH 7,4 в правую заднюю лапу, в объеме 50 мкл. В левую лапу вводят внутрикожно 50 мкл PBS. Группа №1 получила внутрикожную инъекцию 50 мкл 0,1 М PBS pH 7,4 в правую заднюю лапу. В левую лапу вводят внутрикожно 50 мкл PBS.

Через 24 ч после разрешающей инъекции KLH, ГЗТ ответ проявлялся увеличением правой лапы, был измерен параметр набухания лапы, отражающий разницу в сумме толщины и ширины правой и левой лап (М), в различные временные точки после разрешающей инъекции (24, 48 ч), с помощью шкалы микрометра МК-25. В данном исследовании исследовали иммуномодулирующее действие некоторых биорегуляторных композиций на модели гиперчувствительности замедленного типа на линии мышей BALB/c.

Полученные данные свидетельствуют о том, что только биорегуляторная композиция крови статистически достоверно увеличивала реакцию ГЗТ примерно в два раза в течение первых суток после разрешающей инъекции. Биорегуляторная композиция, выделенная из алоэ, имела выраженную тенденцию к повышению реакции ГЗТ (примерно в 1,5 раза), статистически достоверно не отличающуюся от контрольной группы. Биорегуляторные композиции из тимуса (мозговое вещество) и селезенки имели тенденцию к понижению реакции ГЗТ (примерно в 2 раза), а биорегуляторная композиция из костного мозга выраженную тенденцию к снижению реакции ГЗТ (примерно в 2 раза), но статистически достоверно не отличающуюся от контрольной группы. Биорегуляторная композиция из тимуса (корковое вещество) также статистически достоверно снижала реакцию ГЗТ в 3 раза, по сравнению с контрольной реакцией ГЗТ в данной серии опытов. Таким образом, на фоне введения всех исследуемых биорегуляторных композиций, кроме биорегуляторной композиции крови и тимуса (корковое вещество), после реакции сенсибилизации не происходило достоверного изменения реакции ГЗТ. Увеличение реакции ГЗТ под действием биорегуляторной композиции крови может быть обусловлено активацией эффекторных Т клеток (в основном клеток Th1). (Табл. 2, Фиг 37).

Биорегуляторная композиция из крови обладала восстанавливающим иммуномодулирующим действием, активирующим Т-клеточный иммунитет. Данная композиция, скорее всего, не участвует в подготовке иммунной системы к ответу, а непосредственно участвует на этапе развивающейся иммунной реакции (в противоположность биорегуляторным композициям из костного мозга и тимуса (мозговое вещество)). Увеличение реакции ГЗТ под действием биорегуляторной

композиции крови может быть обусловлено активацией эффекторных Т клеток (в основном клеток Th1). Биорегуляторная композиция из тимуса (корковое вещество) обладала восстанавливающим иммуномодулирующим действием, снижала реакцию ГЗТ. Снижая реакцию ГЗТ данная композиция проявляет антиаллергенные свойства и может участвовать в снижении воспалительных реакций при различных аутоиммунных заболеваниях за счет регуляции выброса цитокинов (влияющих на развитие реакции ГЗТ) эффекторными Т клетками после повторного взаимодействия с антигеном. Также реакция ГЗТ может снижаться за счет уменьшения прямого цитотоксического действия Т лимфоцитов на клетки мишени, которые приобрели аутоиммунные свойства, либо уменьшения выделения лизосомальных ферментов макрофагами. Также может происходить стимуляция Т клеток супрессоров. Биорегуляторная композиция из селезенки имела лишь тенденцию к снижению реакции ГЗТ, статистически недостоверную, при введении их после сенсибилизации модельным антигеном.

Также было выявлено профилактическое иммуномодулирующее действие биорегуляторных композиций на данной модели.

Цель эксперимента: выявить профилактическое действие биорегуляторных композиций на реакцию ГЗТ.

#### Методика

Сформированы группы мышей BALB/с по 8 шт. в каждой:

№1 (контроль), №2 (контроль ГЗТ), №3 Биорегуляторная композиция из алоэ, №4 Биорегуляторная композиция из подорожника.

Красные столбики - данные достоверно отличимые от контрольной группы ГЗТ ( $p < 0,05$ ).

Сформированы группы мышей BALB/с по 8 шт. в каждой:

№1 (контроль), №2 (контроль ГЗТ), №3 Биорегуляторная композиция из алоэ, №4 Биорегуляторная композиция из подорожника.

1 день Иммунизация Препаратом. в/брюшинно введение препаратов в объеме 200 мкл на PBS 0,1 М (группы №2-№4). в/брюшинно введение PBS 0,1 М 200 мкл группа №1.

2 день Сенсибилизация KLH (гемоцианин из лимфы улитки, Sigma, Nemocyanin from *Megathura crenulata*).

Группы №1-№4. Каждая группа была сенсибилизирована подкожной инъекцией между лопаток 100 мкг KLH (в 0,1 М PBS pH 7,4), растворенном в ПАФ в соотношении 1:1, в объеме 200 мкл/мышь.

Разрешающая инъекция KLH. На 14-й день после сенсибилизации.

Группа №1 получила внутрикожную инъекцию 50 мкл 0,1 М PBS pH 7,4 в правую заднюю лапу. В левую лапу вводят внутрикожно 50 мкл PBS.

Группы №2-№4. Каждая группа получила внутрикожную инъекцию 20 мкг/мышь KLH в 0,1 М PBS pH 7,4 в правую заднюю лапу, в объеме 50 мкл. В левую лапу вводят внутрикожно 50 мкл PBS. Через 24 ч после разрешающей инъекции KLH, ГЗТ ответ проявлялся увеличением правой лапы, был измерен параметр, отражающий разницу в сумме толщины и ширины правой и левой лап (М), в различные временные точки после разрешающей инъекции (24, 48 и 72 ч), с помощью шкалы микрометра МК-25.

Увеличение реакции ГЗТ в опытных группах говорит о стимуляции клеточного иммунитета: происходит активация CD4 Т-клеток воспаления (Th1 клеток) и макрофагов, которые продуцируют цитокины. Все эти процессы, направленные на изоляцию патогена (или какого-либо иного антигена), завершаются за 24-48 часов формированием воспалительного очага. Воспаление подключается к иммунному ответу в качестве

дополнительной защитной реакции, способствующей фиксации, разрушению и элиминации аллергена. В очаге воспаления в основном присутствуют макрофаги и лимфоциты, нейтрофилов практически нет. Полученные данные свидетельствуют о том, что биорегуляторная композиция из подорожника в данных условиях эксперимента усиливает сенсибилизацию к модельному антигену (гемоцианину), что выражается в увеличении воспаления и реакции ГЗТ примерно в 2 раза (Табл. 3; Фиг 38). Причем, данный эффект удерживался в течение 48 часов, после разрешающей инъекции (табл. 4; ФИГ. 39). Через 48 часов, после разрешающей инъекции биорегуляторная композиция из алоэ имела тенденцию к снижению реакции ГЗТ (в 1,2 раза), но она была статистически не достоверной и может говорить о тенденции влияния данной биорегуляторной композиции в качестве антиаллергенного средства. Это согласуется с антиаллергенными свойствами препаратов, полученных на основе сока алоэ. Таким образом, на фоне введения биорегуляторной композиции из подорожника достоверно усиливается реакция ГЗТ, которая обладает пролонгированным действием в течение 48 часов, т.е. биорегуляторная композиция из подорожника может способствовать активации клеточного иммунитета - стимуляция пролиферации Т-лимфоцитов, выделению ими различных медиаторов, в итоге приводящих к воспалению, хемотаксису и удержанию в области повреждения макрофагов, фагоцитарная активность которых активируется. Все это выражается в воспалительной реакции продуктивного типа, максимум которой приходится на первые 48 часов, к третьим суткам воспаление проходит после элиминации антигена. На фоне введения биорегуляторной композиции из алоэ у мышей происходит статистически недостоверное уменьшение реакции ГЗТ.

**Таблица 3. Данные по реакции гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ) через 24 часа после разрешающей инъекции.**

| № группы                                      | M±m (мм)   |
|-----------------------------------------------|------------|
| 1 (контроль)                                  | 0,08±0,06* |
| 2 (ГЗТ)                                       | 0,95±0,24  |
| 3 (биорегуляторная композиция из алоэ)        | 0,98±0,25  |
| 4 (биорегуляторная композиция из подорожника) | 1,93±0,22* |

\* - звездочкой помечены данные, достоверно влияющие на реакцию ГЗТ (p<0,05).

M (средняя разность суммы правой и левой лап у мышей в группе)

m (стандартное отклонение от среднего).

**Таблица 4. Данные по реакции гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ) через 48 часа после разрешающей инъекции.**

| № группы                                      | M±m (мм)   |
|-----------------------------------------------|------------|
| 1 (контроль)                                  | 0,11±0,04* |
| 2 (ГЗТ)                                       | 0,24±0,05  |
| 3 (биорегуляторная композиция из алоэ)        | 0,18±0,11  |
| 4 (биорегуляторная композиция из подорожника) | 0,5±0,05*  |

\* - звездочкой помечены данные, достоверно влияющие на реакцию ГЗТ ( $p<0,05$ ).

M (средняя разница суммы правой и левой лап у мышей в группе)

m (стандартное отклонение от среднего).

В другом эксперименте исследовали профилактическое действие на реакцию ГЗТ других композиций.

Сформировано 9 групп мышей BALB/c по 8 шт. в каждой:

№1 (контроль), №2 (контроль ГЗТ), №3 (контроль), №4 Биорегуляторная композиция из крови, №5 Биорегуляторная композиция из тимуса (мозговое вещество), №6 Биорегуляторная композиция из тимуса (корковое вещество), №7 Биорегуляторная композиция из костного мозга, №8 Биорегуляторная композиция из селезенки. №9 (контроль).

1 день Иммунизация Препаратом. в/брюшинно введение препаратов в объеме 200 мкл на физ. р-ре (группы №4-№9). в/брюшинно введение физ. р-ра 200 мкл группа №3.

2 день Сенсibilизация KLH (гемоцианин из лимфы улитки, Sigma, Nemocyanein from *Megathura crenulata*).

Группы №3-№9. Каждая группа была сенсibilизирована подкожной инъекцией между лопаток 100 мкг KLH (в 0,1 М PBS pH 7,4), растворенном в ПАФ в соотношении 1:1, в объеме 200 мкл/мышь.

Группа №2 (ГЗТ) была сенсibilизирована подкожной инъекцией между лопаток 100 мкг KLH (в 0,1 М PBS pH 7,4), растворенном в ПАФ в соотношении 1:1, в объеме 200 мкл/мышь.

Группа №9 была сенсibilизирована подкожной инъекцией между лопаток физ. р-ром, растворенном в ПАФ в соотношении 1:1, в объеме 200 мкл/мышь.

Разрешающая инъекция KLH. На 14-й день после сенсibilизации.

Группа №3 получила внутрикожную инъекцию 50 мкл 0,1 М PBS pH 7,4 в правую заднюю лапу. В левую лапу вводят внутрикожно 50 мкл PBS.

Группы №4-№8

Каждая группа получила внутрикожную инъекцию 20 мкг/мышь KLH в 0,1 М PBS

pH 7,4 в правую заднюю лапу, в объеме 50 мкл. В левую лапу вводят внутривенно 50 мкл PBS.

Группа №2 (ГЗТ) получила внутривенную инъекцию 20 мкг/мышь KLH в 0,1 М PBS pH 7,4 в правую заднюю лапу, в объеме 50 мкл. В левую лапу вводят внутривенно 50 мкл PBS.

Группа №1 (контроль) получила внутривенную инъекцию 20 мкг/мышь KLH в 0,1 М PBS pH 7,4 в правую заднюю лапу, в объеме 50 мкл. В левую лапу вводят внутривенно 50 мкл PBS.

Группа №9 получила внутривенную инъекцию 20 мкг/мышь KLH в 0,1 М PBS pH 7,4 в правую заднюю лапу, в объеме 50 мкл. В левую лапу вводят внутривенно 50 мкл PBS.

Через 24 ч после разрешающей инъекции KLH, ГЗТ ответ проявлялся увеличением правой лапы, был измерен параметр, отражающий разницу в сумме толщины и ширины правой и левой лап (М), в различные временные точки после разрешающей инъекции (24, 48 и 72 ч), с помощью шкалы микрометра МК-25.

Увеличение реакции ГЗТ в опытных группах говорит о стимуляции клеточного иммунитета: происходит активация CD4 Т-клеток воспаления (Th1 клеток) и макрофагов, которые продуцируют цитокины. Все эти процессы, направленные на изоляцию патогена (или какого-либо иного антигена), завершаются за 24-48 часов формированием воспалительного очага. Полученные данные свидетельствуют о том, что биорегуляторные композиции из тимуса (мозговое вещество) и биорегуляторная композиция из костного мозга в данных условиях эксперимента усиливают сенсibilизацию к модельному антигену (гемоцианину), что выражается в увеличении реакции ГЗТ и воспаления примерно в 2 раза. Биорегуляторные композиции из тимуса (корковое вещество), биорегуляторная композиция из селезенки имеют тенденцию к усилению реакции ГЗТ (примерно в 1,8 раза), но при статистической обработке оказались недостоверно отличимы от группы с контрольной реакцией ГЗТ. Таким образом, на фоне введения биорегуляторных композиций из тимуса (мозговое вещество) и биорегуляторной композиции из костного мозга достоверно усиливается реакция ГЗТ, т.е. они могут способствовать активации клеточного иммунитета. (Табл. 5. Фиг. 40).

**Таблица 5. Данные по реакции гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ).**

| № группы     | М±m (мм)   |
|--------------|------------|
| 1 (контроль) | 0,15±0,13* |
| 2 (ГЗТ)      | 1,04±0,14  |
| 3 (контроль) | 0,17±0,03* |

|    |                                                               |            |
|----|---------------------------------------------------------------|------------|
|    | 4 биорегуляторная композиция из крови                         | 1,12±0,25  |
| 5  | 5 биорегуляторная композиция<br>из тимуса (мозговое вещество) | 1,98±0,33* |
| 10 | 6 биорегуляторная композиция<br>из тимуса (корковое вещество) | 1,62±0,41  |
| 15 | 7 Биорегуляторная композиция<br>из костного мозга)            | 1,80±0,25* |
|    | 8 Биорегуляторная композиция из селезенки                     | 1,79±0,43  |
| 20 | 9 (контроль)                                                  | 0,29±0,14* |

\* - звездочкой помечены данные, достоверно влияющие на реакцию ГЗТ (p<0,05).

М (средняя разница суммы правой и левой лап у мышей в группе)  
m (стандартное отклонение от среднего).

Исходя из полученных данных по влиянию биорегуляторных композиций на реакцию ГЗТ (усиление реакции ГЗТ при введении биорегуляторных композиций, выделенных из тимуса (мозговое вещество) и костного мозга, при условии их введения до сенсibilизации модельным антигеном, (при введении их после сенсibilизации они не оказывали никакого модулирующего действия. Скорее всего, исследуемые в данном эксперименте биорегуляторные композиции из тимуса и костного мозга играют роль в процессах подготовки иммунной системы к ответу, а не участвуют уже на стадии развивающейся иммунной реакции (когда происходит активация и продукция лимфоцитов и выброс ими цитокинов). Тот же самый эффект мы наблюдали и для биорегуляторной композиции из подорожника. Биорегуляторная композиция из крови обладала восстановительным иммуномодулирующим действием, активирующим Т-клеточный иммунитет. Данная композиция не участвует в подготовке иммунной системы к ответу, а непосредственно участвует на этапе развивающейся иммунной.

Биорегуляторная композиция из тимуса (корковое вещество) обладала восстанавливающим иммуномодулирующим действием, снижая реакцию ГЗТ, тем самым проявляя антиаллергенные свойства и участвуя в снижении воспалительных реакций при различных аутоиммунных заболеваниях за счет регуляции выброса цитокинов (влияющих на развитие реакции ГЗТ) эффекторными Т клетками после повторного взаимодействия с антигеном.

Пример 20. Исследование действия биорегуляторных композиций на модели индуцированного фиброза печени у крыс *in vivo*

Фиброз печени индуцировали с помощью регулярного внутрибрюшинного введения

CCl<sub>4</sub> в количестве 1 мкл/г веса животного в 30%-ном растворе персикового масла согласно стандартным методикам. Инъекции проводили в течение 60 дней дважды в неделю. В эксперименте использовали крыс породы Wistar в возрасте двух месяцев 180-200 г. В эксперименте использовали группы животных: крысы, получавшие  
 5 внутрибрюшинные инъекции CCl<sub>4</sub> - 1 мкл/г в виде 30% масляного раствора (персиковое масло) 2 раза в неделю (группа №1); крысы, получавшие внутрибрюшинные инъекции CCl<sub>4</sub> и биорегуляторную композицию, выделенную из печени крыс, в концентрации, соответствующей 10<sup>-12</sup> мг белка/мл (группа №2); интактный контроль (группа №3).  
 10 Для проведения гистологического исследования печени крысы проводили забор биологического материала до начала эксперимента (контроль), на 30-е сутки эксперимента. Полученные гистологические препараты анализировали с использованием световой микроскопии на микроскопе Leica DM RXA2 (Leica, Германия).

На 30-е сутки эксперимента в группе крыс с индуцированным фиброзом (группа №1)  
 15 выявили очаги коллагеновых тяжей в области портальных трактов. Тяжи коллагена начинают распространяться по периферии дольки печени, образуя множественные порто-портальные септы. В периферических областях дольки коллагеновых волокон не было обнаружено. Наблюдала жировую дистрофию печени, поскольку большая часть гепатоцитов была заменена жировыми клетками. На 30-е сутки эксперимента в  
 20 группе крыс с индуцированным фиброзом, получавших с питьевой водой биорегуляторную композицию, выделенную из печени (группа №2), были выявлены очаги коллагеновых тяжей и единичные порто-портальные септы, а также не выражена была жировая дистрофия печени, гепатоциты сохранялись. (Фиг. 41). В данной работе было показано, что при пероральном приеме биорегуляторной композиции, выделенной  
 25 из печени, на фоне токсического повреждения печени крыс снижаются темпы развития фиброза. Гепатопротекторное действие данной биорегуляторной композиции, можно объяснить ее действием на клеточные источники регенерации в данной ткани.

Пример 21. Изучено влияние биорегуляторной композиции, выделенной из простаты, на состояние ткани этой железы *in vitro*. Была выбрана модель органотипического  
 30 культивирования предстательной железы мыши *in vitro*. Срок культивирования долей простат мышей составил 24 часа. За этот период времени в культивируемой ткани предстательной железы наблюдали значительную гибель клеток секреторного эпителия (контроль), тем не менее, ткань продолжала оставаться жизнеспособной, особенно в краевых зонах, сохраненной оставалась структура отдельных желез и протоков. Следует  
 35 отметить отсутствие выработки секрета в контрольных культурах (Фиг. 42). При добавлении в питательную среду биорегуляторной композиции из предстательной железы в ткань происходила активная выработка секрета, обладающего однородной консистенцией.

Таким образом, данная модель позволила выявить стимулирующее секреторную  
 40 функцию клеток простаты действие биорегуляторной композиции, выделенной из предстательной железы.

Пример 22. Влияние биорегуляторных композиций, выделенных из крови и кости, на хрящ и кости

Были использованы взрослые тритоны, их наркотизировали в MS-222, а затем были  
 45 ампутированы у них левая задняя конечность на уровне голени. Образующиеся регенераты на стадии образования трех-четырех пальцев удаляли у анестезированных животных, дезинфицировали этиловым спиртом и помещали в темные флаконы с 4 мл культуральной среды для амфибий (контроль) или со средой, в которую было добавлено



40 мкл FGF- $\beta$  в концентрации  $10^{-10}$  мг/мл (положительный контроль) или 40 мкл биорегуляторной композиции крови в дозе  $10^{-12}$  мг/мл или кости в дозе  $10^{-10}$  мг/мл (опыты). Перед использованием среда проходила холодную стерилизацию через фильтры (0.22 мкм поры). Состав среды для культивирования: Среда 199 - 350 мл, дистиллированная вода - 150 мл, Буфер HEPES 1М - 150 мкл, Гентамицина сульфат 4% - 1 мл, Антибиотик и антимикотик SIGMA - 5 мл, Эмбриональная телячья сыворотка - 50 мл. Регенераты конечностей тритона культивировали в RollerRM5 Assistant, Germany. 35 об/мин, (22°C) в течение 12 дней. Среда для культивирования меняли каждые 3 дня. После этого регенераты конечности были зафиксированы в Буэне для дальнейшего приготовления гистологических срезов.

В интактных регенератах хвостов тритонов на 40-ой день после ампутации обнаруживаются следующие элементы: хорошо выраженная хрящевая ткань, спинной мозг, мышечные волокна, сосуды, формируются подкожные железы, пигментированные клетки звездчатой формы, расположенные под многослойным эпителием кожи, а также множество недифференцированных мезенхимных клеток (Фиг. 43.). После культивирования состояние регенератов в контроле существенно отличалось от состояния интактных регенератов хвостов, развившихся у тритонов после ампутации (Фиг. 43). Можно отметить выраженные процессы дегенерации во всех тканях регенерата. Имеет место гибель клеток хрящевой ткани, хондроциты отсутствуют, а на месте хряща присутствуют апоптирующие клетки. В кориуме выявлены малодифференцированные клетки. По сравнению с интактными, эпителий слущивается, в нем присутствует много гибнущих клеток, в кориуме культивируемых регенератов под многослойным эпителием кожи наблюдаются зрелые подкожные железы, наполненные секретом, пигментные клетки образуют плотные скопления под эпителием, хорошо представлены мышечные волокна. В общем можно наблюдать картину воспаления и дегенерации в тканях регенерата.

Под действием FGF- $\beta$  происходит поддержание структуры хряща, но эпителий деградирует. В соединительной ткани сосуды не выражены, присутствует много мышечных клеток, фибробластоподобных клеток и коллагеновых волокон. Хондроцитов мало, лакуны вокруг хондроцитов небольшие, хрящевой матрикс волокнистый.

Биорегуляторная композиция крови поддерживала состояние регенерата при культивировании в целом, сохраняя гистоструктуру и их жизнеспособность, но при этом эпителий слущивался, наблюдали изменение структуры хряща (Фиг. 43), биорегуляторная композиция кости поддерживала целостность в основном хрящевой ткани, а также способствовала началу сегментации хряща, характерному для данной стадии (Фиг. 43).

Таким образом, биорегуляторные композиции кости и крови поддерживали хрящевые структуры, препятствуя их дегенерации и процессам воспаления в конечностях амфибий.

Таким образом, как следует из представленных данных, заявленная биорегуляторная композиция как биологически активная субстанция наглядно демонстрирует ярко выраженную специфическую активность на состояние различных тканей и органов.

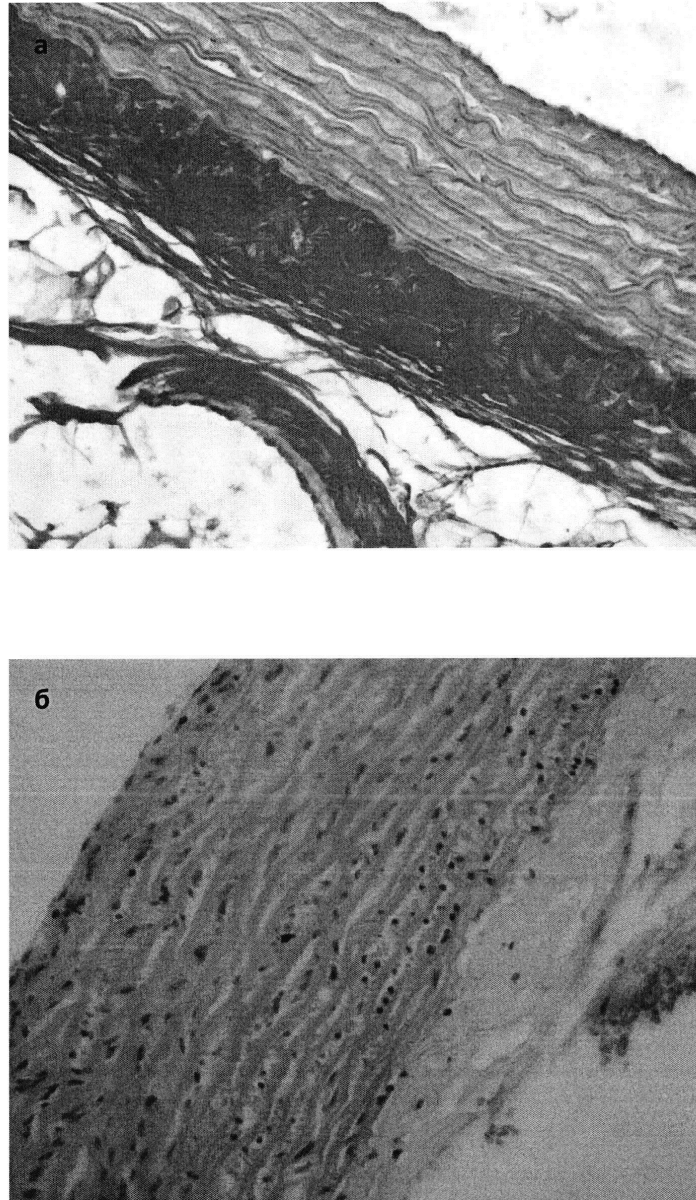
#### (57) Формула изобретения

1. Биологически активная субстанция в виде биорегуляторной композиции, обладающая поддерживающим и восстановительным действием на ткани и органы, выражающимся в сохранении статуса адгезии клеток и тканей, пролиферации и дифференцировке клеток, а также в поддержании жизнеспособности клеток и

предупреждении нарушения целостности тканей и межклеточного пространства, и включающая фракции пептидно-белкового регулятора, выделенные из межклеточного пространства различных тканей животных, растений и грибов, разделенных и собранных методами изоэлектрофокусирования из анодного пространства, с изоэлектрической точкой  $pI=8,0-10,0$  и  $pI=3,9-5,5$ , электрофореза и с использованием метода обращенно-фазовой хроматографии ВЭЖХ, и содержащего регуляторные пептиды с молекулярной массой 1000-10000 Да и белки с молекулярной массой 15-70 кДа, и фракции активных органоспецифических рибонуклеопептидов-регуляторов, выделенных из тех же различных тканей животных, растений и грибов в присутствии нейтрального детергента цетавлона и содержащих низкомолекулярные внутриядерные и цитоплазматические рибонуклеопептиды РНП с константой седиментации 3,5-6,5 S (единиц Сведберга), при этом указанные полученные фракции пептидно-белкового регулятора и активных органоспецифических рибонуклеопептидов-регуляторов для образования субстанции смешаны в соотношении от 1:1 до 3:1 в присутствии  $10^{-3}$  М  $\text{CaCl}_2$ .

2. Фармакологическая композиция, обладающая поддерживающим и восстановительным действием на ткани и органы, выражающимся в сохранении статуса адгезии клеток и тканей, пролиферации и дифференцировке клеток, а также в поддержании жизнеспособности клеток и предупреждении нарушения целостности тканей и межклеточного пространства, и включающая биологически активную субстанцию в виде биорегуляторной композиции по п. 1 в количестве  $10^{-7}-10^{-14}$  мг/мл и фармацевтически приемлемый носитель, выбранный из группы, включающей водно-солевой физиологический раствор или дистиллированную воду.

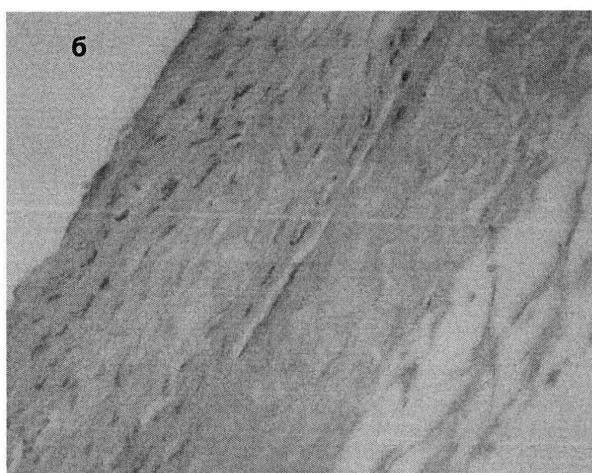
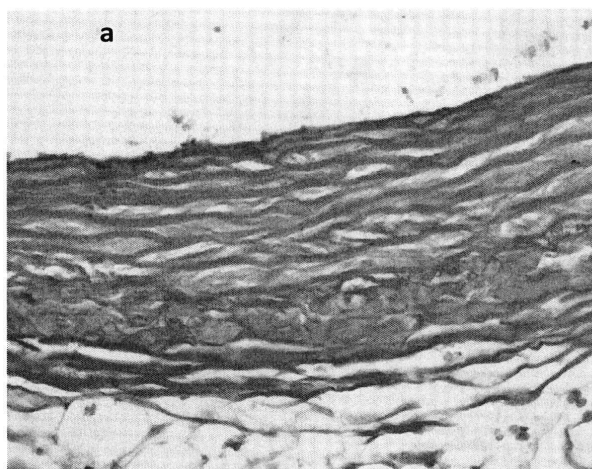
1



Фиг. 1. Гистологическая картина нативной артерии крысы.

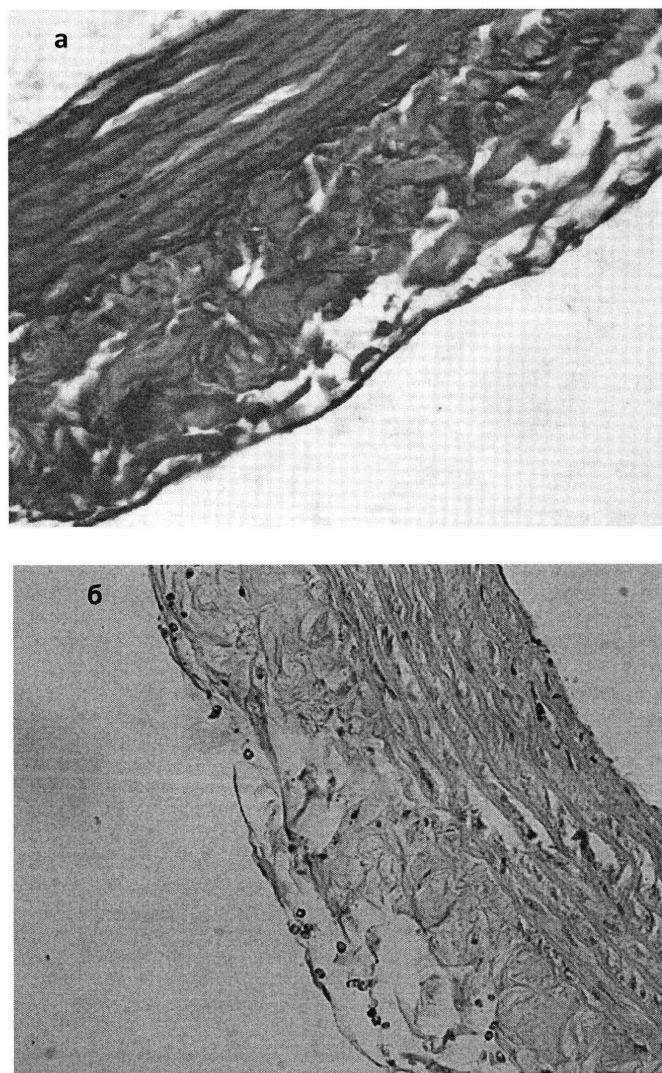
Ув. Ок.х10, об.х40. а). - Окраска по Ван-Гизону,б) - окраска гематоксилин-эозином.

2



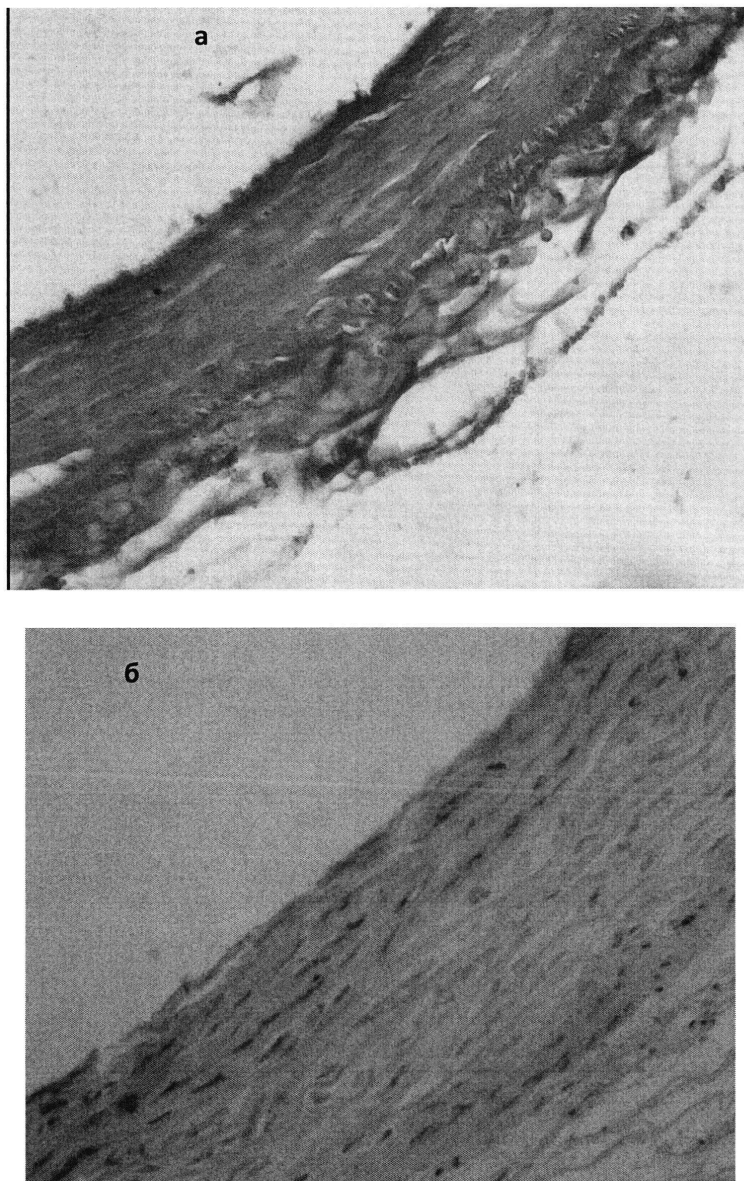
Фиг. 2. Состояние артерии после 7 дней роллерного культивирования без добавления каких-либо дополнительных факторов (контроль).

Ув. Ок.х10, об.х40. а). - Окраска по Ван-Гизону; б) – окраска гематоксилин-эозином.

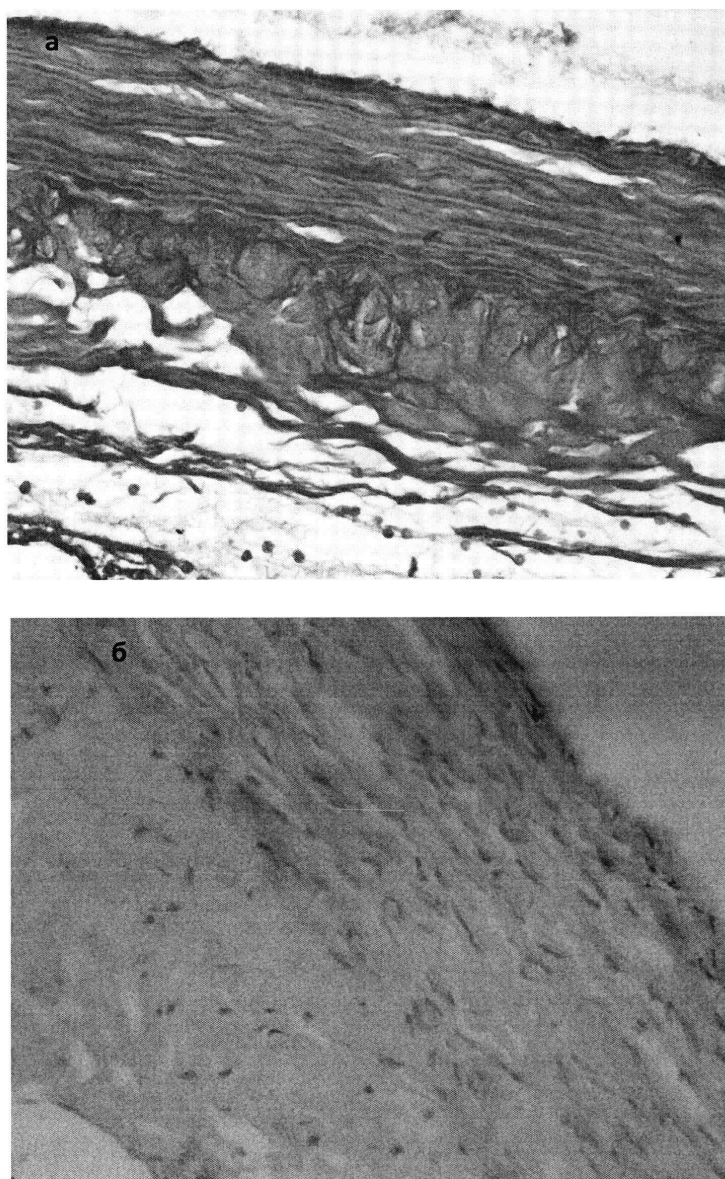


Фиг. 3. Состояние артерии после 7 дней роллерного культивирования с добавлением в культуральную среду биорегуляторной композиции из крови.

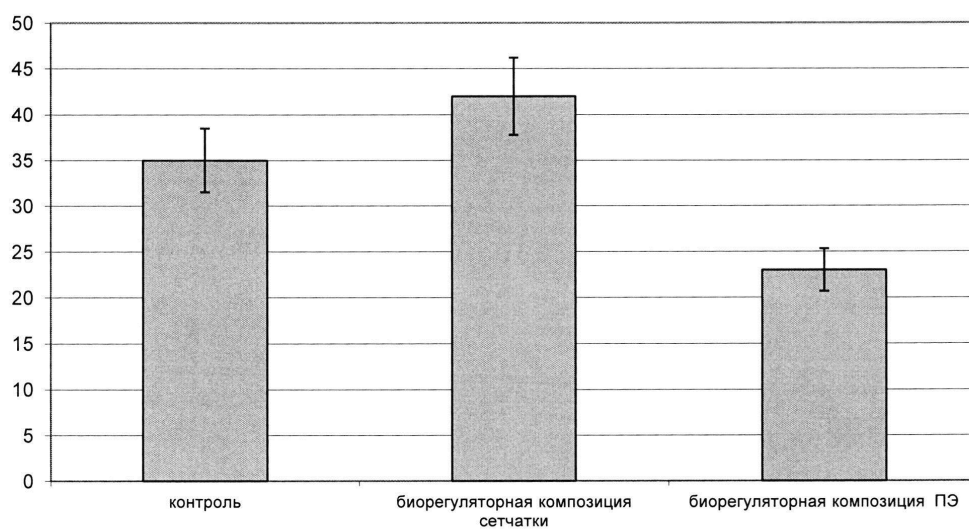
Ув. Ок.х10, об.х40. а). - Окраска по Ван-Гизону; б) - окраска гематоксилин-эозином.



Фиг. 4. Состояние артерии после 7 дней роллерного культивирования с добавлением в культуральную среду биорегуляторной композиции из листьев лещины. Ув. Ок.х10, об.х40. а). - Окраска по Ван-Гизону; б) - окраска гематоксилин-эозином.



Фиг. 5. Состояние артерии после культивирования роллерного 7 дней с добавлением в культуральную среду биорегуляторной композиции из аорты, полученной как описано в примере 1.Ув. Ок.х10, об.х40. а). - Окраска по Ван-Гизону; б) - окраска гематоксилин-эозином.

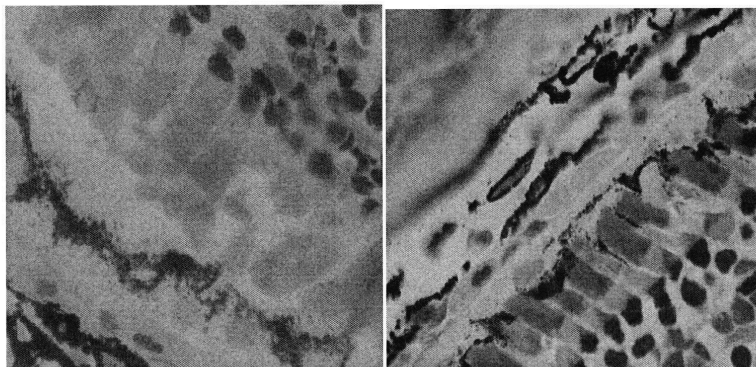


Фиг. 6. Относительная ширина сосудистой оболочки глаза тритона при органотипическом стационарном культивировании заднего отдела глаза. По оси ординат относительная ширина сосудистой оболочки относительно ширины всех оболочек глаза.



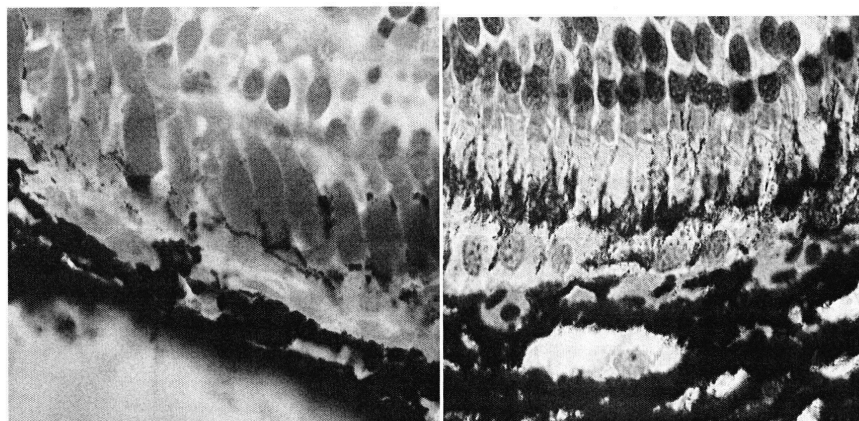
а)

б)

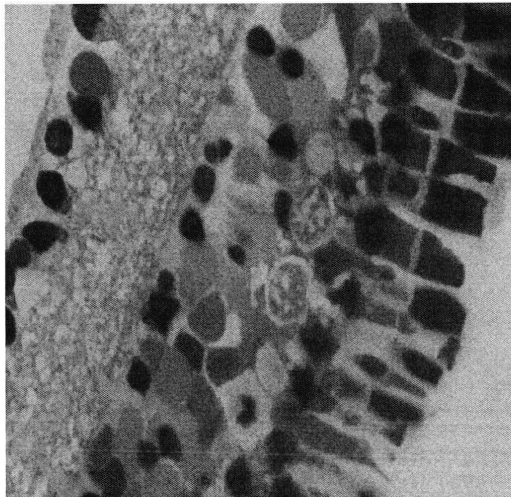


в)

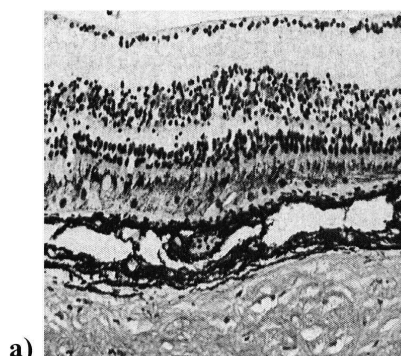
г)



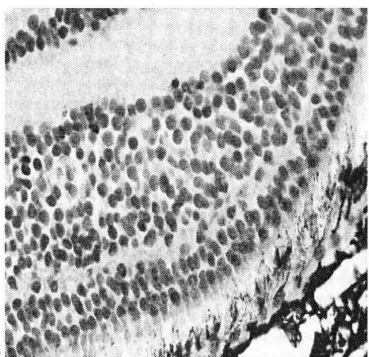
Фиг. 7. Состояние сосудистой оболочки и ПЭС глаза тритона *Pl. Waltl.* После культивирования заднего отдела глаза тритона *invitro*. Ув. Ок.х10, об.х40) а) – без добавления (контроль); б) – после добавления в среду культивирования биорегуляторной композиции сетчатки; в) – биорегуляторной композиции пигментного эпителия, г) биорегуляторная композиция ягод черники



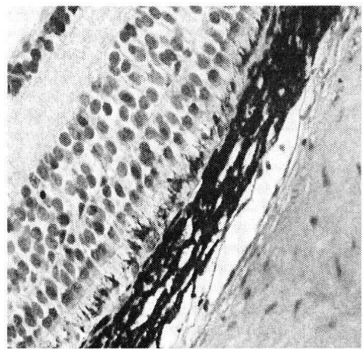
Фиг. 8. Морфология жизнеспособных и погибающих клеток сетчатки после культивирования заднего отдела глаза тритона *invitro* в течение 2-х сут: ув. ок.х10, об.х40



а)

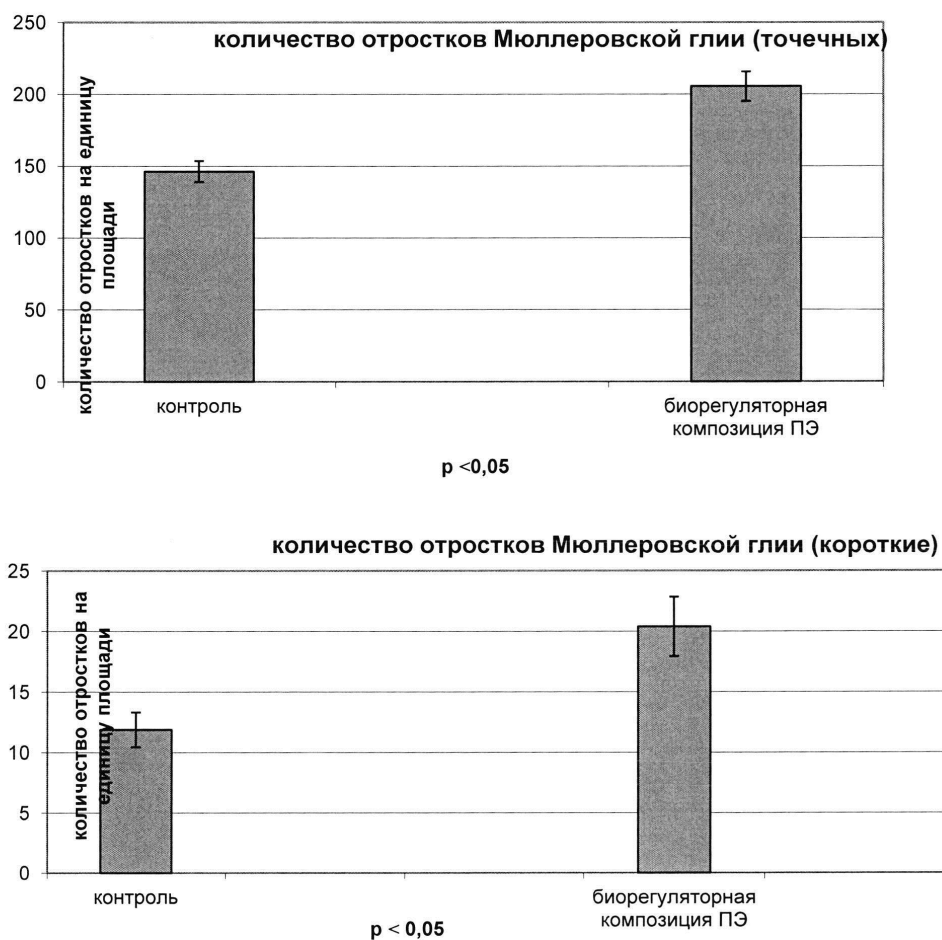


б)

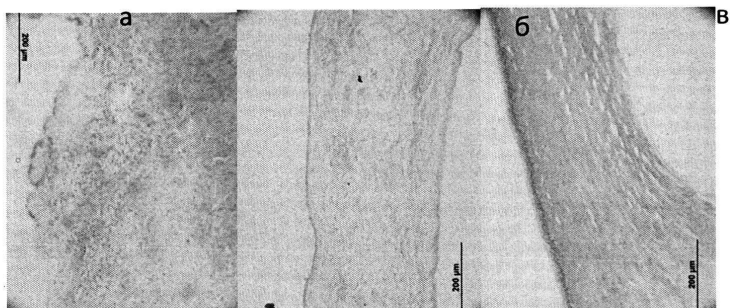


в)

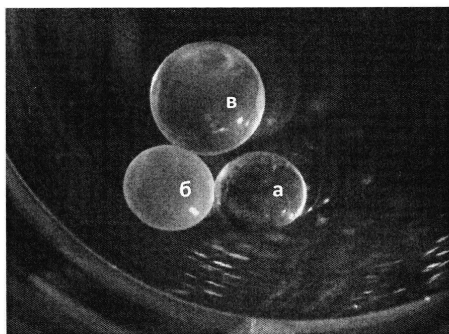
Фиг. 9. Состояние сосудистой оболочки и ПЭС глаза тритона *Pl. waltil*. после культивирования *invitro*. Парафиновые срезы (7мкм). а) – без добавления (контроль, ув. ок.х10, об.х20); б) – после добавления в среду культивирования биорегуляторной композиции сетчатки (ув. ок.х10, об.х20); в) – биорегуляторной композиции ПЭ (ув. ок.х10, об.х20).



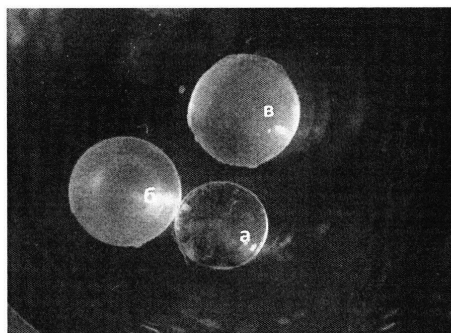
**Фиг.10. Гистограммы, отражающие количество отростков клеток Мюллеровской глии при культивировании заднего отдела глаза тритона.**



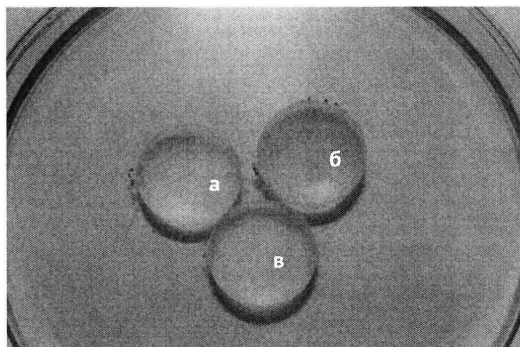
**Фиг. 11.** Ранозаживление роговицы кроликов под воздействием: а) – физиологического раствора; б) – биорегуляторной композиции, выделенной из крови быка; в) – биорегуляторной композиции, выделенной из роговицы глаза быка. Ув. 10х20



Фиг. 12. Культивирование хрусталиков амфимий: а) контроль (культивирование без катарактогенных агентов); б) – воздействие пероксида водорода; в) – воздействие пероксида водорода и биорегуляторной композиции из хрусталика быка.

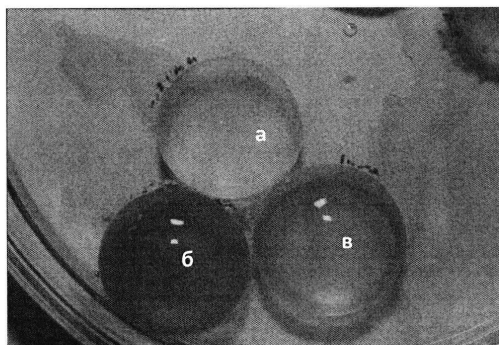


Фиг. 13. Культивирование хрусталиков амфимий: а) контроль (культивирование без катарактогенных агентов); б) – воздействие хлорида кальция; в) – воздействие хлорида кальция и биорегуляторной композиции из хрусталика быка.

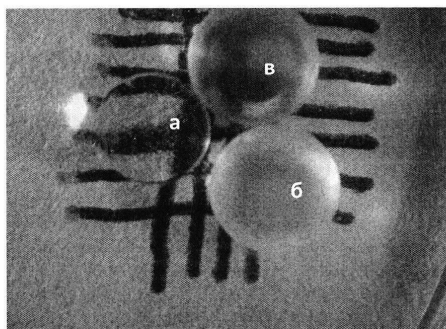


Фиг. 14. Культивирование хрусталиков быка: а) контроль (культивирование без катарактогенных агентов); б) – воздействие хлорида кальция; в) – воздействие хлорида кальция и биорегуляторной композиции из хрусталика быка.

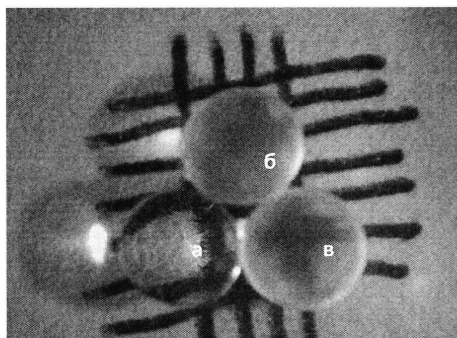




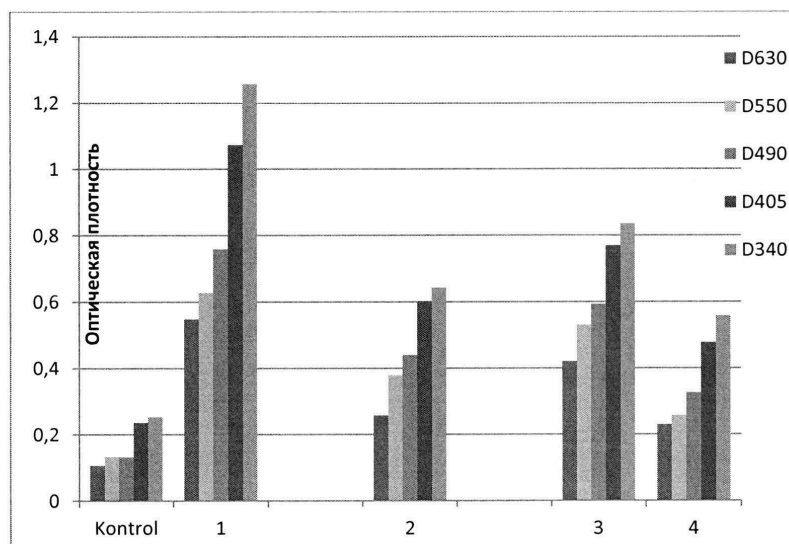
Фиг. 15. Культивирование хрусталиков быка: а) контроль (культивирование без катарактогенных агентов); б) – воздействие пероксида водорода; в) – воздействие пероксида водорода и биорегуляторной композиции из хрусталика быка.



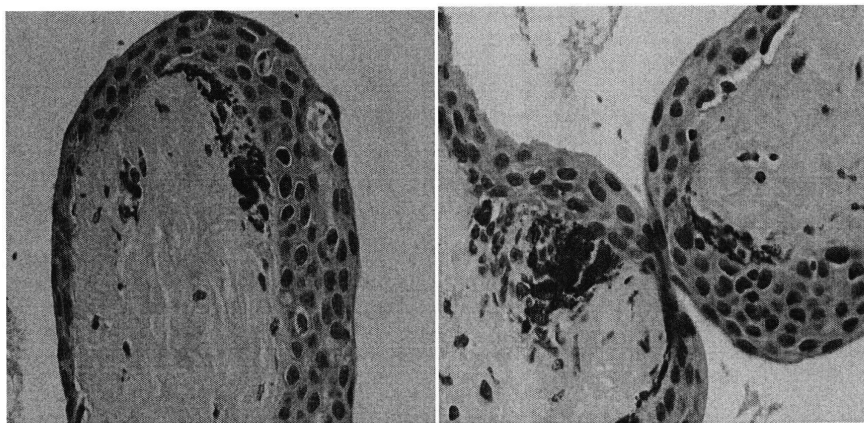
Фиг. 16. Культивирование хрусталиков крыс: а) контроль (культивирование без катарактогенных агентов); б) – воздействие пероксида водорода; в) – воздействие пероксида водорода и биорегуляторной композиции из хрусталика быка.



Фиг. 17. Культивирование хрусталиков крыс: а) контроль (культивирование без катарактогенных агентов); б) – воздействие хлорида кальция; в) – воздействие хлорида кальция и биорегуляторной композиции из хрусталика быка.



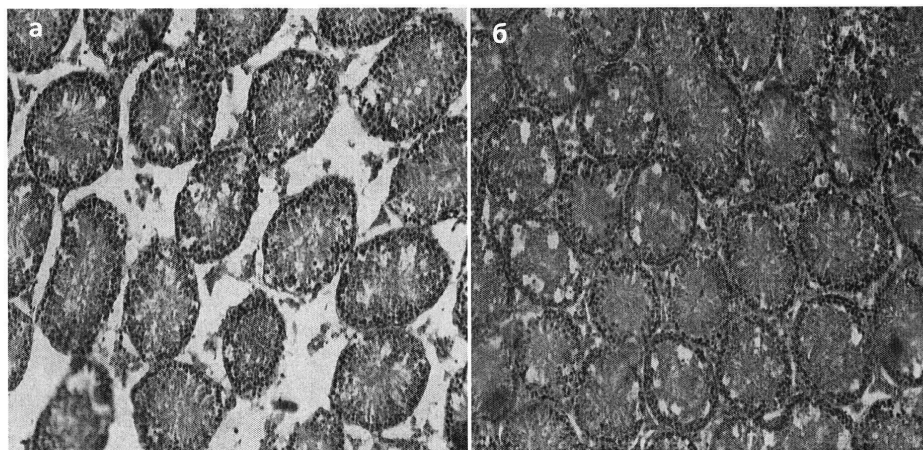
Фиг. 18. Оптическая плотность при разных длинах волн хрусталиков крыс, культивируемых в: контроль – питательной среде, 1 – в питательной среде, содержащей 0,5мМ  $H_2O_2$ , 2 - в питательной среде, содержащей 0,5мМ  $H_2O_2$  и биорегуляторную композицию хрусталика быка, 3 – в питательной среде, содержащей 15мМ  $CaCl_2$ , 4 - в питательной среде, содержащей 15мМ  $CaCl_2$



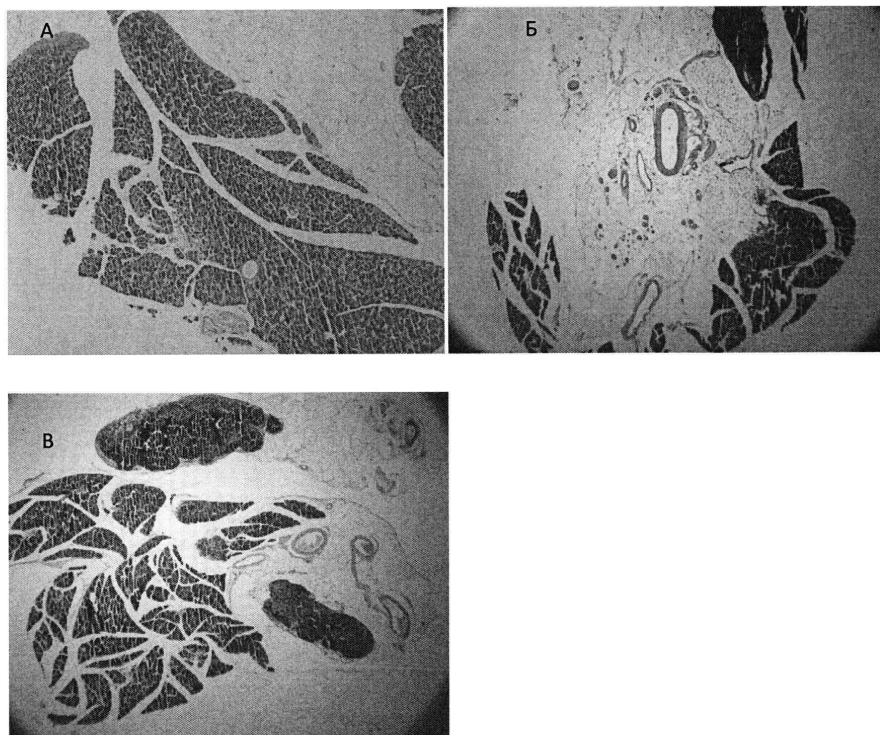
а)

б)

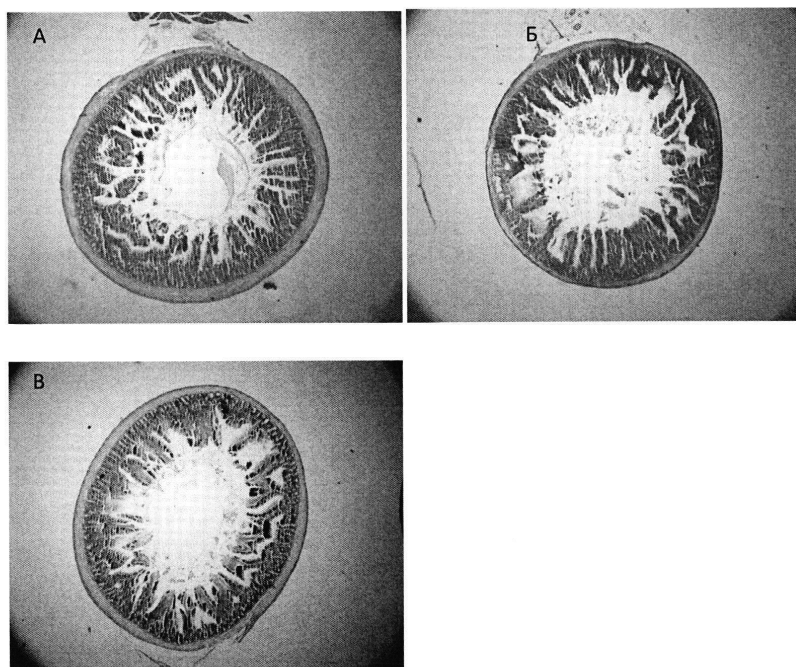
Фиг. 19 Роллерное культивирование роговицы тритона с областью лимба: а)- контроль, без добавления в среду культивирования каких-либо факторов; б) – с добавлением в среду культивирования биорегуляторной композиции роговицы глаза быка.



Фиг. 20. Состояние семенников мыши после 4-х дней культивирования: а) – контроль, просто в питательной среде; б) – опыт, в среде, содержащей биорегуляторную композицию семенников крыс.

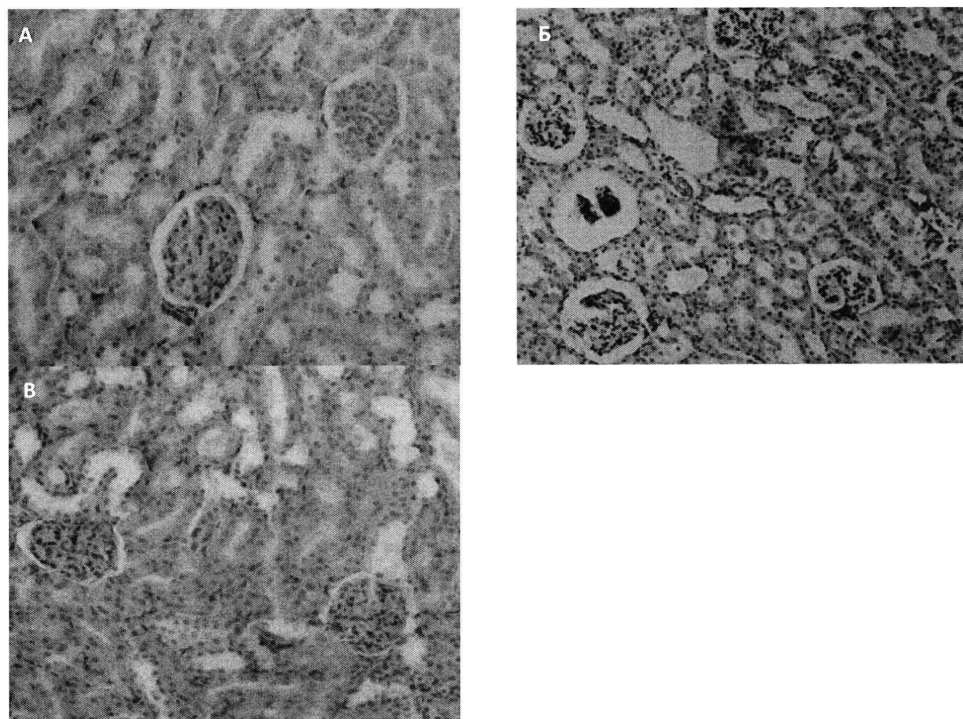


Фиг. 21. Состояние поджелудочной железы крысы на гистологическом срезе: а – нативная ткань, б – после индуцированного панкреонекроза, в – после индуцированного панкреонекроза и добавлении биорегуляторной композиции из поджелудочной железы.

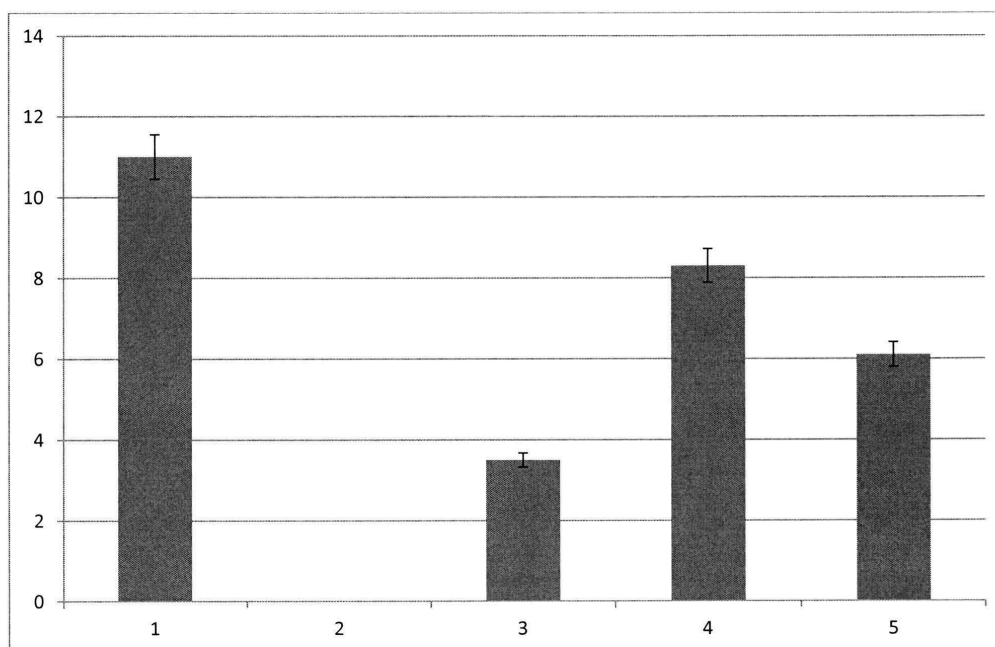


Фиг. 22. Состояние двенадцатиперстной кишки крысы на гистологическом срезе: а – нативная ткань, б – при индуцированном панкреонекрозе, в –при индуцированном панкреонекрозе и добавлении биорегуляторной композиции поджелудочной железы.



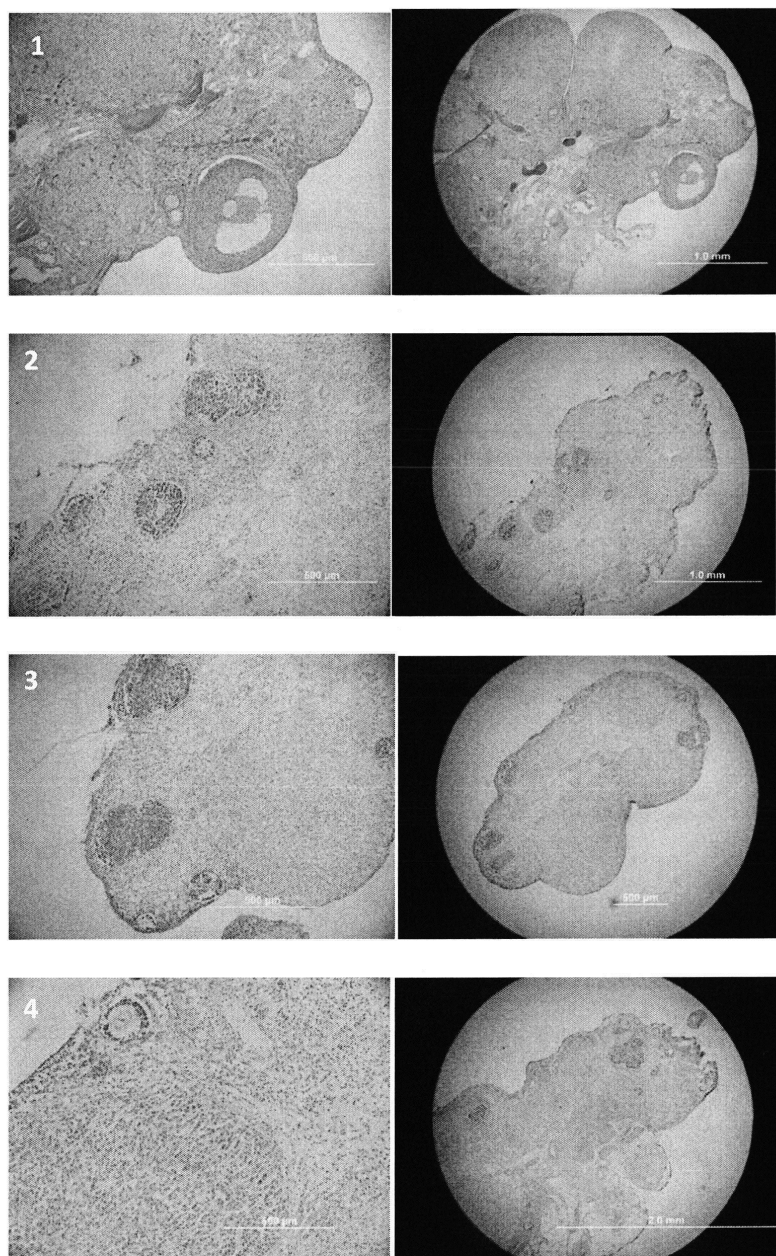


Фиг. 23. Клубочки в почках крысы на гистологическом срезе, окраска гематоксилином-эозином: а – нативная ткань, б – при индуцированном панкреонекрозе, в – при индуцированном панкреонекрозе и добавлении биорегуляторной композиции из поджелудочной железы.

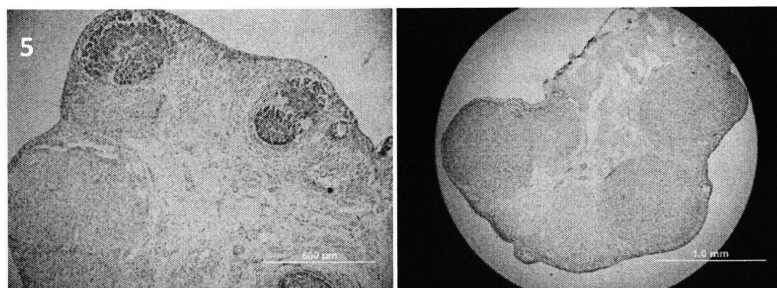


**Фиг. 24.** Общее количество жизнеспособных фолликулов (1) – в нативных яичниках, (2) - при культивировании яичников, (3) - при культивировании яичников с добавлением биорегуляторной композиции из крови, (4) - с добавлением биорегуляторной композиции из семенников, (5) - с добавлением биорегуляторной композиции из яичников.

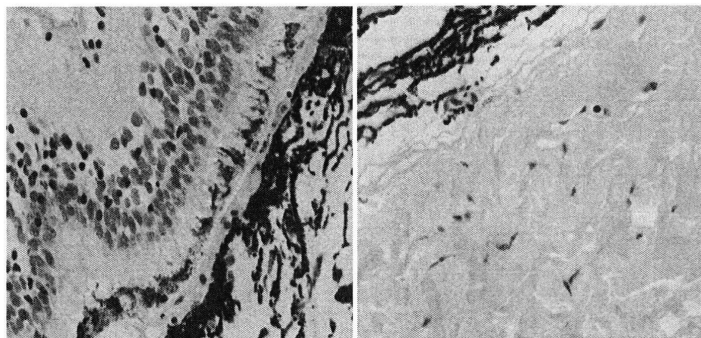
По оси ординат среднее количество фолликулов на гистологическом срезе в каждой группе.



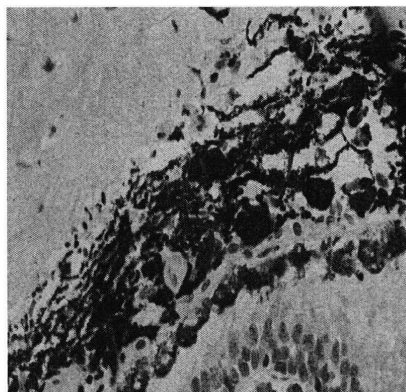
Фиг. 25



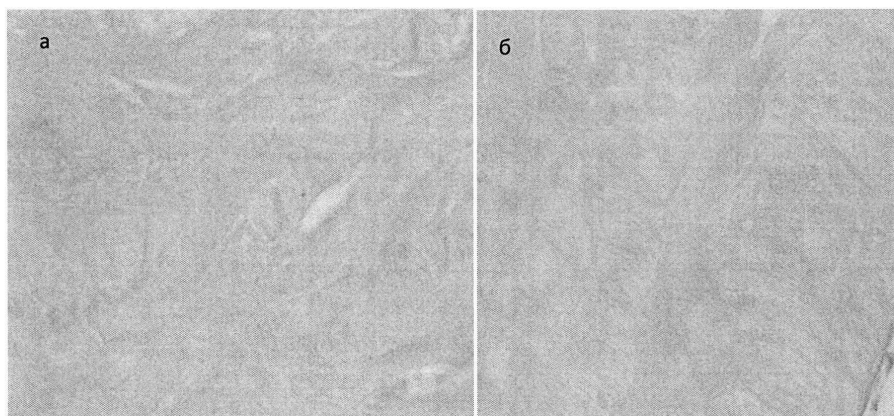
Фиг. 25. Гистологические срезы яичников крысы при увеличении x100 (слева) и x40 (справа). (1) – нативные яичники, (2) - при культивировании яичников в питательной среде (контроль), (3) - при культивировании яичников с добавлением биорегуляторной композиции из крови, (4) - при культивировании яичников с добавлением биорегуляторной композиции из семенников, (5) - при культивировании яичников с добавлением биорегуляторной композиции из яичников.



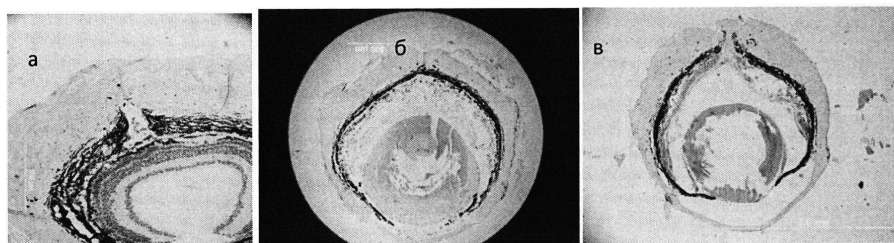
ФИГ. 26. Микрофотография тканей заднего отдела глаза тритона *Pl. waltl* после 10-дневного культивирования без добавления биорегуляторной композиции Ув. ок.х10, об.х20



Фиг. 27 Микрофотографии тканей заднего отдела глаза после 10-дневного культивирования с добавлением исследуемой биорегуляторной композиции из склеры. Ув. ок.х10, об.х20

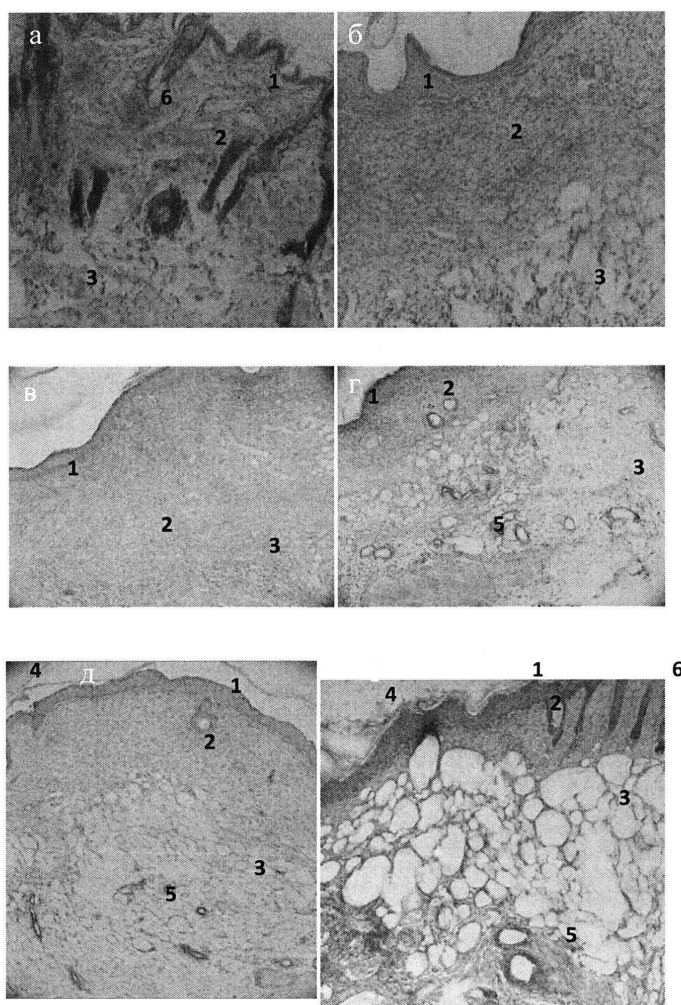


Фиг. 28. Роллерное культивирование изолированной склеральной оболочки глаза тритона в течение 28 дней: а – контроль (без добавления биорегуляторной композиции, б – опыт (с добавлением в среду культивирования биорегуляторной композиции склеры глаза быка в концентрации  $10^{-11}$  мг/мл.

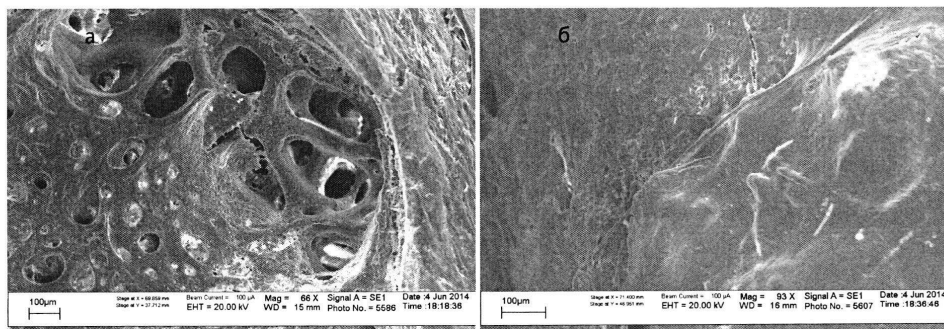


Фиг. 29. А – нативный глаз тритона, Б - роллерное культивирование целого глаза тритона в течение 28 суток без добавления биорегуляторной композиции, В - роллерное культивирование целого глаза тритона в течение 28 суток с добавлением биорегуляторной композиции склеры глаза быка в концентрации  $10^{-9}$  мг/мл.

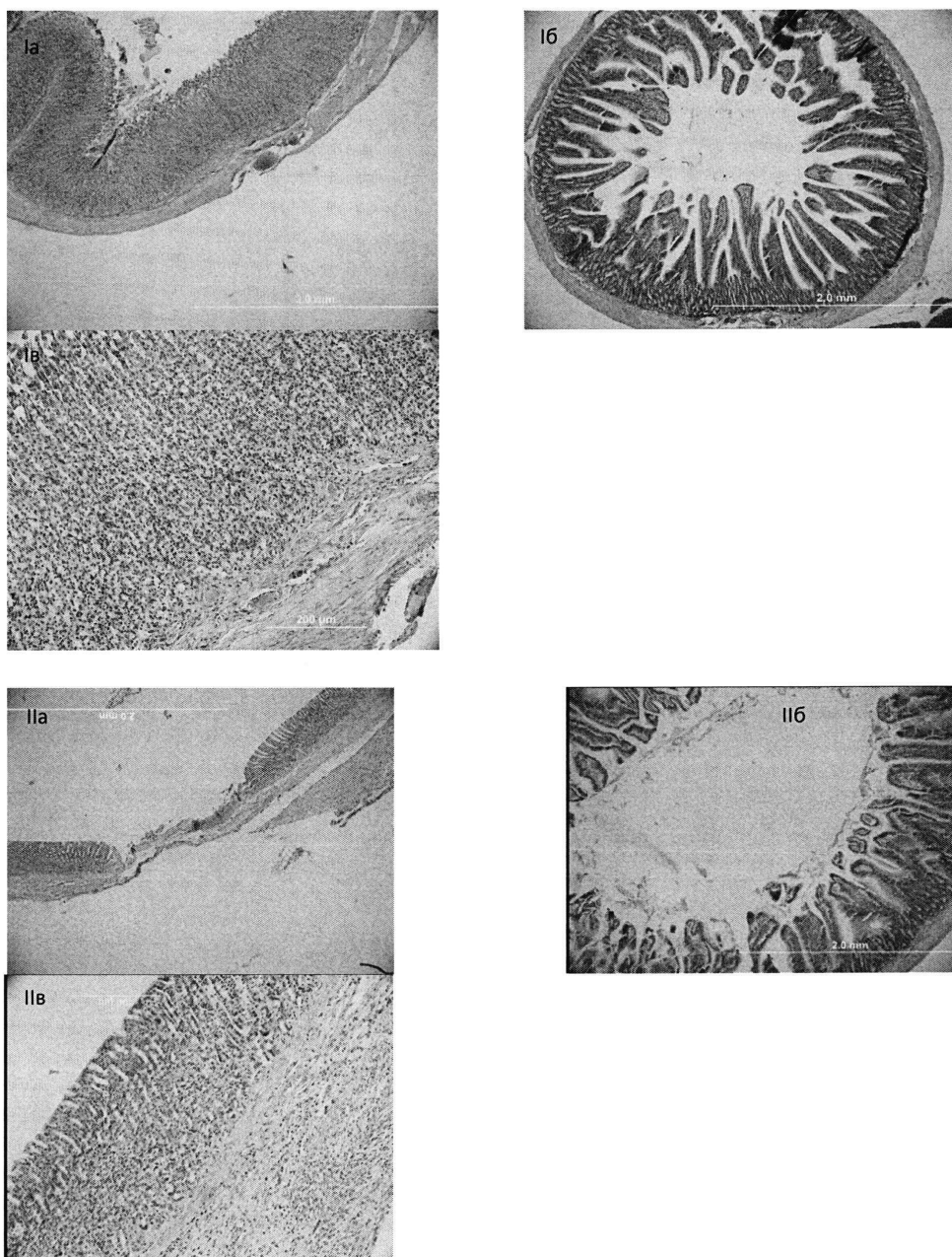




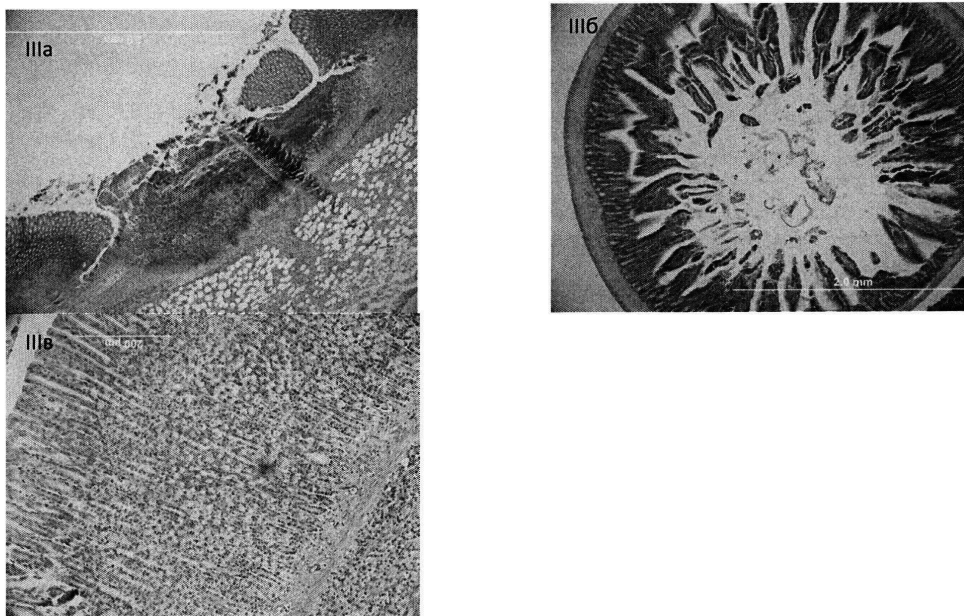
Фиг. 30. Гистологическая картина состояния раны кожи мыши после 11 дней. Ув. x100. Окраска гематоксилином-эозином. а - нативная кожа, б – (1 группа) – сухой контроль (рана затягивалась первичным натяжением), в – (2 группа) – в рану закапывали физиологический раствор, г – (3 группа) – в рану закапывали биорегуляторную композицию из алоэ, д – (4 группа) – в рану закапывали биорегуляторную композицию из подорожника, е – (5 группа) – в рану закапывали биорегуляторную композицию из крови. 1 – эпителий, 2 – дерма, 3 – подкожная жировая ткань, 4 – струп, 5 – протоки желез. 6 – волосяные фолликулы.



Фиг. 31. Через 30 дней состояние костного дефекта в контроле(а) и опыте (с добавлением биорегуляторной композиции крови) (б).

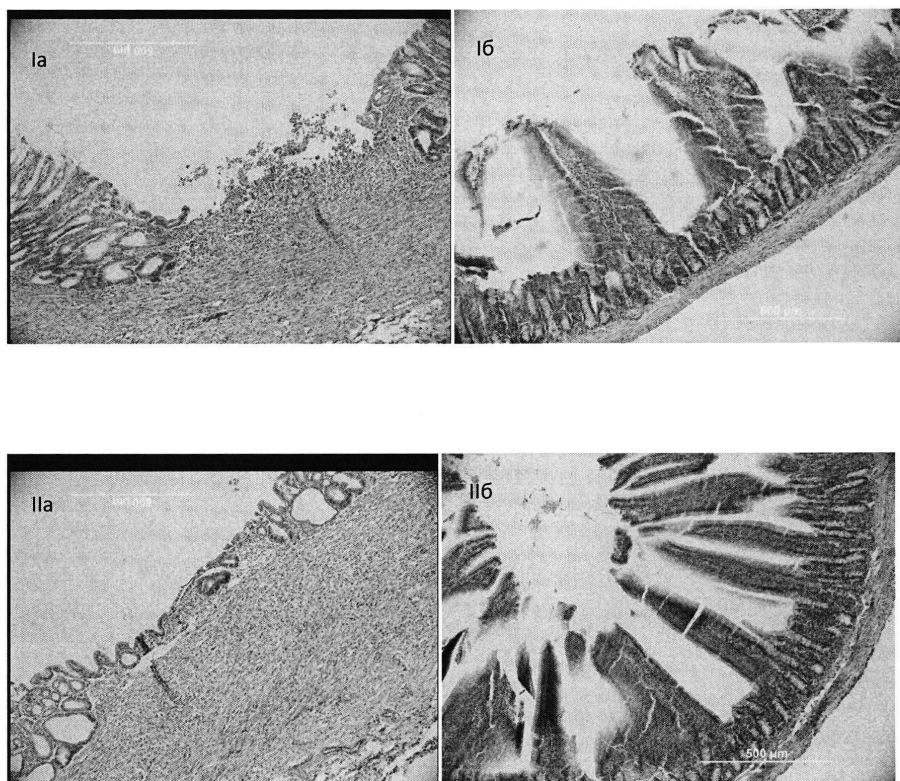


ФИГ. 32



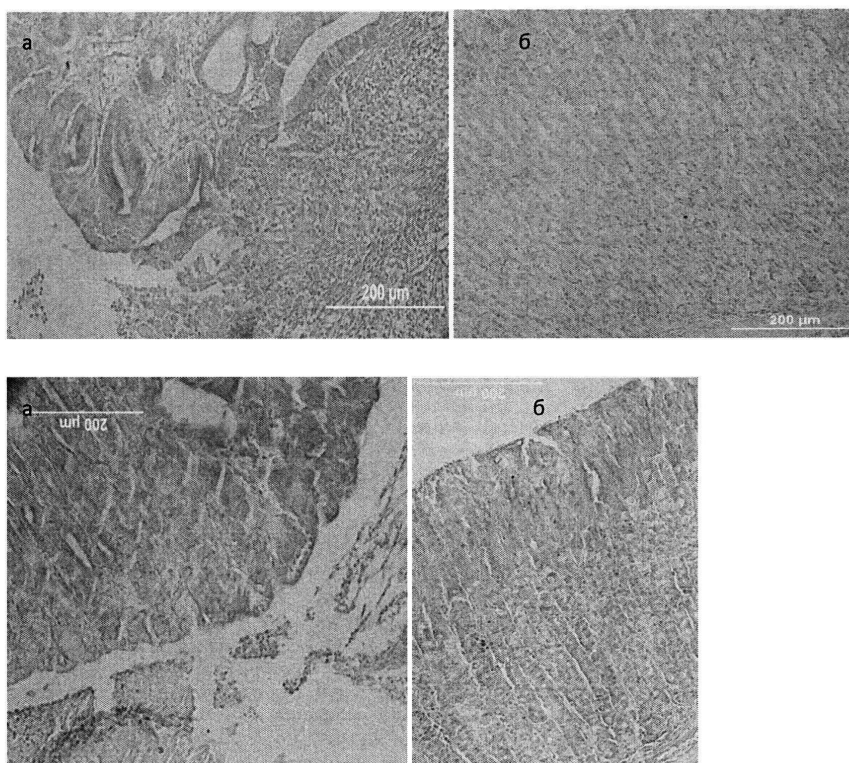
**ФИГ. 32. Гистология тканей на 5 день при экспериментальной язве желудка у крыс, окраска гематоксилином эозином.**

- I. а – Нативный желудок,ув. X50 б –нативная двенадцатиперстная кишка, ув. X50, в – срез стенки нативного желудка, ув. X200.
- II. Экспериментальная язва желудка крысы: а – область язвы, ув. X50; б –двенадцатиперстная кишка, ув. X50; в – состояние стенки желудка, ув. X200
- III. Экспериментальная язва желудка крысы с применением биорегуляторной композиции крови: а – область язвы,ув. X50; б –двенадцатиперстная кишка, ув. X50; в – состояние стенки желудка, ув. X200



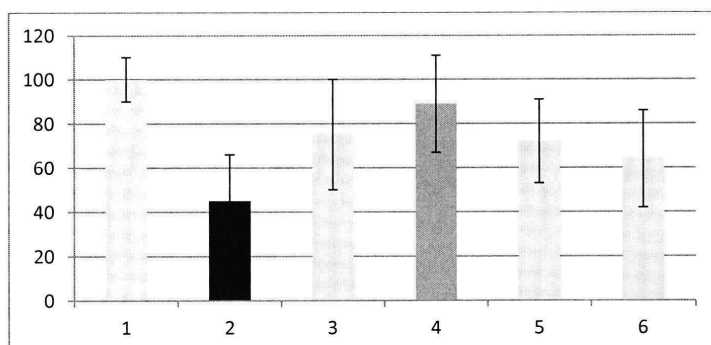
**ФИГ. 33. Гистология тканей на 10 день при экспериментальной язве желудка у крыс, окраска гематоксилином эозином.**

- I. Экспериментальная язва желудка крысы: а – область язвы, б – состояние стенки желудка, ув. x100
- II. Экспериментальная язва желудка крысы с использованием биорегуляторной композиции из крови: а – область язвы, б – состояние стенки желудка, ув. x100



**ФИГ. 34. Гистология тканей на 10 день при экспериментальной язве желудка у крыс, окраска альциановым синим.**

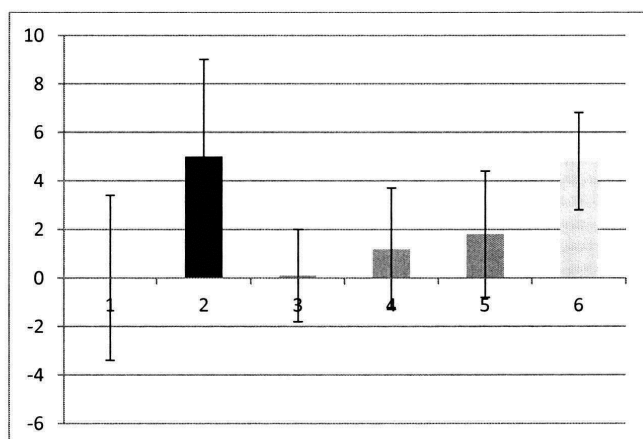
- I. Экспериментальная язва желудка крысы: а – область язвы, б – состояние стенки желудка, ув. x200
- II. Экспериментальная язва желудка крысы с применением биорегуляторной композиции крови: а – область язвы, б – состояние стенки желудка, ув. x200



**Фиг. 35.** Результаты теста «Постановка конечности» проводимого через 30 минут после введения препаратов на 4 неделе опыта. Результаты представлены в % от результата группы здорового контроля.

1 – здоровые животные, 2 (черный столбик) – негативный контроль с индуцированной болезнью Паркинсона, 3 – группа с болезнью Паркинсона, получавшая биорегуляторную композицию крови, 4 – группа с болезнью Паркинсона, получавшая биорегуляторную композицию мозга, 5 – группа с болезнью Паркинсона, получавшая комбинацию биорегуляторных композиций из мозга и крови и препарата сравнения, 6 – группа с болезнью Паркинсона, получавшая препарат сравнения L-DOPA.

Значение группы 4 достоверно отличаются ( $p < 0,05$ ) относительно негативного контроля (группа 2).

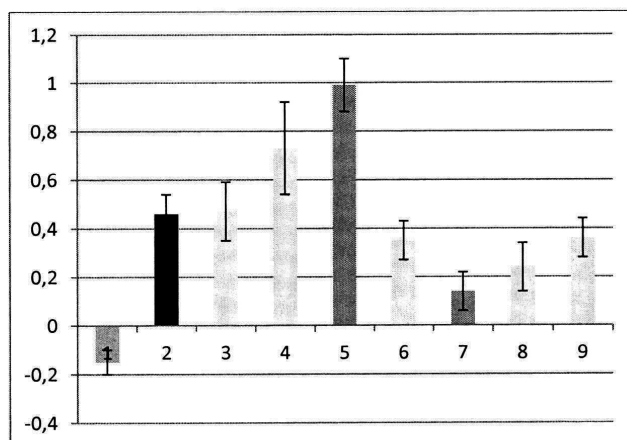


**Фиг. 36.** Результаты теста «Горизонтальная сетка», полученные через 30 минут после введения препаратов на 3 неделе опыта. По оси ординат представлены значения коэффициента асимметрии в %.

1 – здоровые животные, 2 (черный столбик) – негативный контроль с индуцированной болезнью Паркинсона, 3 - группа с болезнью Паркинсона, получавшая биорегуляторную композицию крови, 4 – группа с болезнью Паркинсона, получавшая биорегуляторную композицию мозга, 5 – группа с болезнью Паркинсона, получавшая комбинацию биорегуляторных композиций из мозга и крови и препарата сравнения, 6 - группа с болезнью Паркинсона, получавшая препарат сравнения L-DOPA.

Значения групп 1,3,4,5 достоверно отличаются ( $p < 0,05$ ) относительно негативного контроля (группа 2).

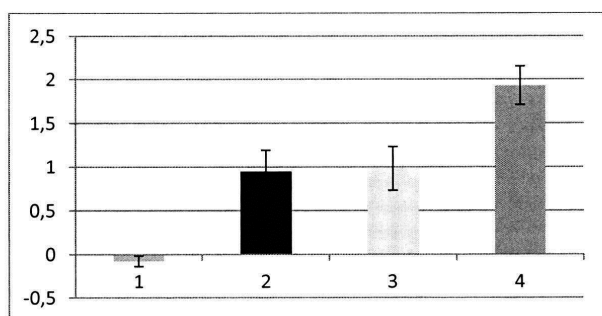




**Фиг. 37.** Реакция ГЗТ через 24 часа после разрешающей инъекции. Серые столбики – отрицательный контроль (нет реакции ГЗТ).

Черный столбик – контрольная реакция ГЗТ (группа сравнения).

Значения в группах 1, 5 и 7 достоверно отличимые от контрольной группы ГЗТ ( $p < 0,05$ ).

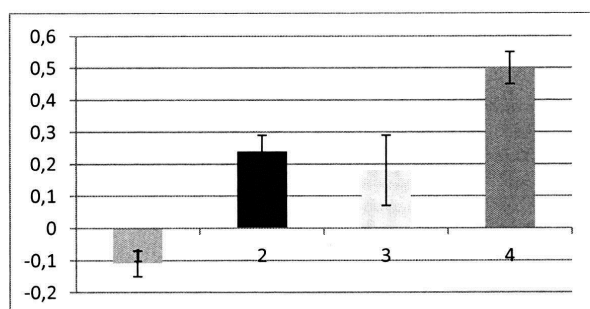


**Фиг. 38.** Реакция ГЗТ через 24 часа после разрешающей инъекции.

Группа 1 – отрицательный контроль (нет реакции ГЗТ).

Черный столбик(2 группа) – контрольная реакция ГЗТ (группа сравнения).

Данные групп 1 и 4 достоверно отличимые от контрольной группы ГЗТ ( $p < 0,05$ ).

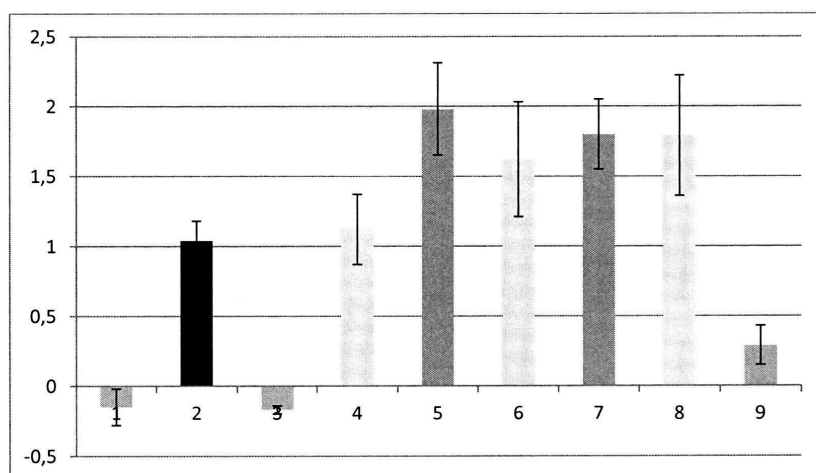


**Фиг. 39** Реакция ГЗТ через 48 часов после разрешающей инъекции.

Группа 1 – отрицательный контроль (нет реакции ГЗТ).

Черный столбик – контрольная реакция ГЗТ (группа 2 сравнения).

Данные групп 1 и 4 достоверно отличимые от контрольной группы ГЗТ ( $p < 0,05$ ).

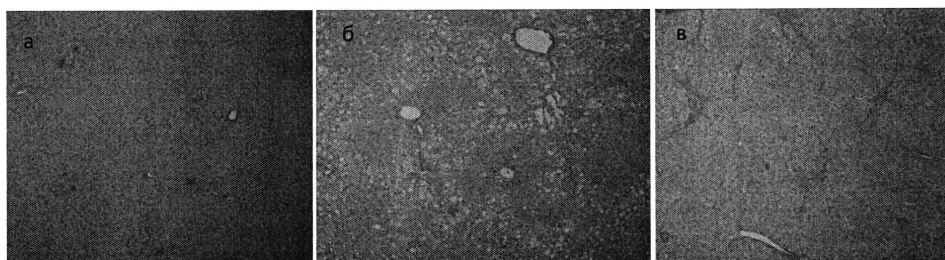


Фиг. 40. Реакция ГЗТ

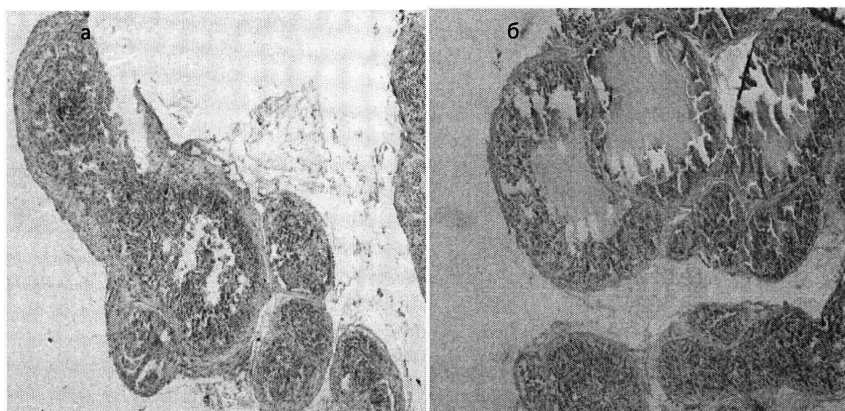
Группы 1, 3, 9 – отрицательный контроль (нет реакции ГЗТ).

Черный столбик – контрольная реакция ГЗТ (группа 2 сравнения).

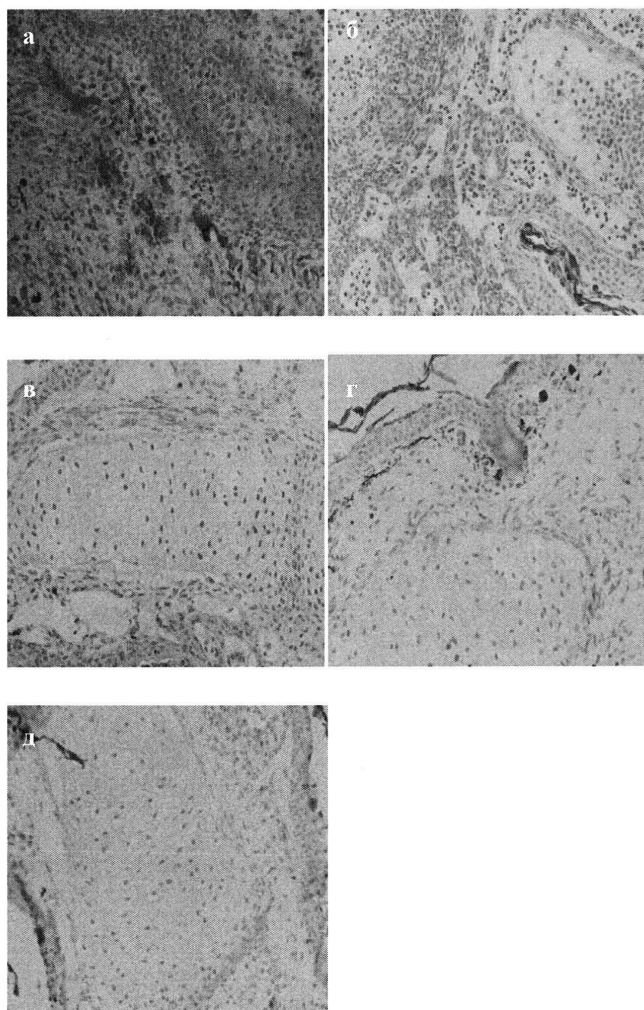
Данные групп 1,3, 5,7 и 9 достоверно отличимые от контрольной группы ГЗТ ( $p < 0,05$ ).



Фиг. 41. Гистологическая картина состояния печени крыс: а – в нативных условиях, б – после индуцированного фиброза, в – после индуцированного фиброза и использования биорегуляторной композиции печени быка.



**Фиг. 42.** Поперечные срезы простат мышей, культивированных в течение 24 ч (а – контроль, без добавления композиции; б – с добавлением биорегуляторной композиции предстательной железы ( $10^{-12}$  мг/мл). Увеличение: - окуляр 10×, объектив 4×.



Фиг. 43. Состояния регенератов задней конечности *Pleurodeles waltl* после роллерного культивирования в течение 12 дней *in vitro*: а) – регенерат без культивирования; б) – контроль (без добавления в среду культивирования каких-либо дополнительных факторов); в) – добавление в среду культивирования биорегуляторной композиции крови в концентрации  $10^{-12}$  мг/мл; г) – добавление в среду культивирования FGF- $\beta$  в концентрации  $10^{-10}$  мг/мл; д) – добавление в среду культивирования биорегуляторной композиции кости в концентрации  $10^{-12}$  мг/мл.