



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ,
ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ(21), (22) Заявка: **2008146459/15**, **24.11.2008**(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
24.11.2008(45) Опубликовано: **20.01.2010** Бюл. № 2(56) Список документов, цитированных в отчете о
поиске: **SU 1624973 A3**, **20.08.1996**. **CA 1224777 A1**,
28.07.1987. **US 4436657 A**, **13.03.1984**.

Адрес для переписки:

690022, г. Владивосток, пр-кт 100-летия
Владивостоку, 159, Тихоокеанский институт
биоорганической химии ДВО РАН, зав.
патентным отделом Н.И. Стадниченко

(72) Автор(ы):

Молчанова Валентина Ильинична (RU),
Чикаловец Ирина Владимировна (RU),
Черников Олег Викторович (RU),
Аминин Дмитрий Львович (RU),
Кривошапка Ольга Николаевна (RU),
Лукьянов Павел Александрович (RU)

(73) Патентообладатель(и):

**ТИХООКЕАНСКИЙ ИНСТИТУТ
БИООРГАНИЧЕСКОЙ ХИМИИ
ДАЛЬНЕВОСТОЧНОГО ОТДЕЛЕНИЯ
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК
(ТИБОХ ДВО РАН) (RU)**

**(54) СРЕДСТВО, ОБЛАДАЮЩЕЕ ИММУНОМОДУЛИРУЮЩИМ,
ПРОТИВОВОСПАЛИТЕЛЬНЫМ И РАНОЗАЖИВЛЯЮЩИМ ДЕЙСТВИЕМ**

(57) Реферат:

Изобретение относится к области медицины и косметологии и касается создания лекарственных средств животного происхождения. Предложено средство, обладающее иммуномодулирующим, противовоспалительным и ранозаживляющим действием, которое характеризуется тем, что оно представляет собой 1,4; 1,6- α -D-глюкан, который содержит глюкозу - не менее 98% и белок - не более 1,5%, и получено из экстракта,

образующегося при нагревании мидий в воде в течение 1,0-2,0 ч при 90-95°C, с последующей его очисткой путем отделения примесей осаждением, диализом на полых волокнах и хроматографией на анионите, предпочтительно на анионите АН-31. Средство не вызывает аллергической реакции замедленного типа, не обладает провоспалительным действием, что приводит к уменьшению побочных эффектов при его терапевтическом применении. 7 табл.

RU 2 379 044 C1

RU 2 379 044 C1



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY,
PATENTS AND TRADEMARKS

(12) ABSTRACT OF INVENTION(21), (22) Application: **2008146459/15, 24.11.2008**(24) Effective date for property rights:
24.11.2008(45) Date of publication: **20.01.2010 Bull. 2**

Mail address:

**690022, g. Vladivostok, pr-kt 100-letija
Vladivostoku, 159, Tikhookeanskij institut
bioorganicheskoj khimii DVO RAN, zav.
patentnym otdelom N.I. Stadnichenko**

(72) Inventor(s):

**Molchanova Valentina Il'ichna (RU),
Chikalovets Irina Vladimirovna (RU),
Chernikov Oleg Viktorovich (RU),
Aminin Dmitrij L'vovich (RU),
Krivoshapko Ol'ga Nikolaevna (RU),
Luk'janov Pavel Aleksandrovich (RU)**

(73) Proprietor(s):

**TIKHOKEANSKIJ INSTITUT
BIOORGANICHESKOJ KHIMII
DAL'NEVOSTOCHNOGO OTDELENIJa
ROSSIJSKOJ AKADEMII NAUK (TIBOKh
DVO RAN) (RU)**

(54) IMMUNOMODULATORY, ANTIINFLAMMATORY AND WOUND HEALING PREPARATION

(57) Abstract:

FIELD: medicine.

SUBSTANCE: invention concerns medicine and cosmetology, and covers development medical products of animal origin. There is offered immunomodulatory, antiinflammatory and wound healing preparation characterised by that it represents 1,4; 1,6- α -D-glucan which contains glucose - at least 98% and protein - no more than 1.5%, and made of an extract formed in heating of

mussels in water during 1.0 - 2.0 hours at 90-95°C, thereafter purified by precipitation of impurities, hollow-fibre dialysis and anionite chromatography, preferentially anionite AN-31.

EFFECT: preparation does not cause delayed reaction, does not express proinflammatory action that leads to reduction of by-effects in therapeutic application.

7 tbl

Изобретение относится к области медицины и косметологии и касается создания средств животного происхождения, обладающих иммуномодулирующим, противовоспалительным и ранозаживляющим действием.

5 Известно средство, обладающее противоопухолевой и иммуномодулирующей активностью, состоящее из водорастворимых гликопротеинов с молекулярной массой от 10 до 300 кДа. Химическое изучение гликопротеина показало, что он содержит 16,8% углеводов (в виде глюкозы), 64,5% белка, а также следовые количества липидов (2,7%), нуклеиновых кислот (1%), золы (1%). Способ получения этого
10 средства основан на использовании отходов переработки свежих моллюсков - экстракта, образующегося при их тепловой обработке. Показано, что для получения биологически активной гликопротеиновой фракции можно использовать жидкость после тепловой обработки почти всех съедобных моллюсков [Sasaki T., Uchida H. et al. Antitumor activity and immunomodulatory effect of glycoprotein fraction from scallop
15 *Patinopecten yessoensis* // *Nipp. Suisan Gakkaishi*. 1987. V.53. №2. P.267-272].

Наиболее близким по технической сущности к заявляемому средству (прототипом) является биогликан - митилан, представляющий собой высокомолекулярный углеводбелковый комплекс и обладающий противоопухолевой активностью [SU
20 1624973 АЗ, 20.08.1996]. В его состав входит углеводный (92-97%) и белковый (3-8%) компоненты. Углеводный компонент является 1,4; 1,6- α -D-глюканом. Белковый компонент является полипептидной фракцией с мол.м. от 3,0 до 14,5 кДа по данным SDS-электрофореза. Молекулярная масса биогликана 2 МДа. Средство получено из сока, образующегося при тепловой обработке промысловых видов мидий.

25 Митилан применяется в косметологии в качестве влагоудерживающего компонента косметических кремов [Молчанова В.И. Митилан (Новости на рынке лечебной косметики) // *Журн. Медлайн-экспресс*. 2003. №7 (164). С.31].

Однако присутствие белковой компоненты в митилане (3-8%), как потенциально
30 аллергогенной, ограничивает его использование в качестве медицинского препарата.

Задачей изобретения является расширение арсенала лекарственных средств из доступных природных источников, в частности из морских беспозвоночных, обладающих иммуномодулирующим, противовоспалительным и ранозаживляющим действием.

35 Задача решена новым средством, обладающим иммуномодулирующим, противовоспалительным и ранозаживляющим действием, характеризующимся тем, что оно представляет собой 1,4; 1,6- α -D-глюкан, который содержит глюкозу - не менее 98% и белок - не более 1,5%, имеет интенсивные сигналы в спектре ^{13}C -ЯМР
40 при 100,3, 99,2, 77,7, 68,5 и 61,05 м.д., удельное вращение $[\alpha]_{\text{D}}^{20} +160^\circ\text{C}$, имеет молекулярную массу 2 МДа и получено из экстракта, образующегося при нагревании мидий в воде в течение 1,0-2,0 час при 90-95 $^\circ\text{C}$, с последующей его очисткой путем отделения примесей осаждением, диализом на полых волокнах и хроматографией на анионите, предпочтительно на анионите АН-31.

45 Технический результат, обеспечиваемый изобретением, заключается в создании нового иммуномодулирующего, противовоспалительного и ранозаживляющего средства из морских беспозвоночных. Технический результат заключается также в том, что по сравнению с прототипом заявляемое средство не вызывает аллергической
50 реакции замедленного типа, таким образом, не обладает провоспалительным действием, что в конечном итоге обеспечит уменьшение количества побочных эффектов при его терапевтическом применении.

Кроме того, заявляемое средство более чем в 2 раза по сравнению с прототипом

увеличивает лизосомальную активность у перитонеальных макрофагов мышей, а также проявляет более выраженное ранозаживляющее действие.

Получение заявляемого средства.

Свежевыловленные мидии предварительно очищают от загрязнений (разбитые створки, бисус, нарощие другие морские беспозвоночные - асцидии, черви).

Подготовленное сырье заливают водой. Экстракцию осуществляют в течение 1,5 часов при температуре 90-95°C. Полученный экстракт охлаждают, фильтруют через плотную ткань (бязь) и добавляют 50% уксусную кислоту до изменения pH раствора от 6,4-6,8 до pH 4,5-5,0. Образовавшийся осадок, содержащий балластные белки, отделяют центрифугированием. Супернатант диализуют на установке с полыми волокнами (Millipore) для удаления низкомолекулярных примесей.

Белок, присутствующий в растворе в количестве не менее 6,3% (в пересчете на сухое вещество и содержание влаги), удаляют путем хроматографии на анионите, предпочтительно на анионите АН-31. Затем раствор концентрируют и лиофильно высушивают. Получают целевой продукт с выходом 0,67% от веса сырой мидии.

Продукт имеет следующие физико-химические характеристики:

- порошок белого цвета хорошо растворим в воде;

- нерастворим в спирте, ацетоне, гексане;

- молекулярная масса 2 МДа (определена методом аналитического ультрацентрифугирования);

- содержание углеводов (в пересчете на D-глюкозу) - не менее 98%, (определено фенол-сернокислотным методом) [Dubois M et. al. Colorimetric method for determination of sugars and related substances // Anal. Chem. 1956. V.28. P.350-358];

- содержание белка - не более 1,5%, (определено методом Лоури) [Lowry O.K. et. al. Protein measurements with the Folin phenol reagent // J. Biol. Chem. 1951. V.193. P.265-275];

- моносахаридный состав в виде ацетатов полиолов определен газожидкостной хроматографией [Merkle R.K., Poppe I. Carbohydrate composition analysis of glycoconjugates by gas-liquid chromatography/mass spectrometry // Methods Enzymol. 1994. V.230. P.1-15];

- удельное вращение $[\alpha]_D^{20} +160^\circ\text{C}$;

- ^{13}C -ЯМР спектры (100,3; 99,2; 77,7; 68,5; 61,05 м.д.) получены при 80°C на ЯМР-спектрометре Bruker-Avance - 500 с рабочей частотой 125 МГц. Образцы полисахаридов растворяли в D_2O .

Новое средство получило название «неомитилан».

Исследование токсичности

Определение острой токсичности

Острую токсичность исследовали на мышах линии CD-1 весом 19-21 г, по 5 животных в каждой исследуемой группе. Раствор неомитилана в дистиллированной воде вводили внутрибрюшинно в объеме 0,5 мл на животное. Наблюдение и оценка токсического эффекта производились в течение 12 дней. Установлено что заявляемое средство нетоксично при его внутрибрюшинном введении в дозах от 78,1 до 2500 мг/кг.

Определение цитотоксической активности

Для определения цитотоксической активности получали мышинные лимфоциты (спленоциты) из селезенки мышей линии CD-1 [Фрешни Р. Культура животных клеток. Методы. М.: Мир, 1989. 319 с.]. С этой целью мышей забивали методом перивисцеральной дислокации, извлекали селезенку и измельчали ее с помощью гомогенизатора в физрастворе, а затем клеточную суспензию пропускали через нейлоновый газ (280 меш). Полученную взвесь спленоцитов отмывали от дебриса

трижды физраствором с помощью центрифугирования (1500 об/мин, 5 мин, 5°C, центрифуга Heraeus Labofuge 400R, Германия) и ресуспендировали в необходимом количестве физраствора. Конечная концентрация клеток в суспензии была $2-5 \times 10^6$ клеток/мл. В лунки 96-луночной планшеты вносили по 20 мкл исследуемого вещества в разных концентрациях и по 200 мкл суспензии спленоцитов и инкубировали 1 час при 37°C. Затем в каждую лунку добавляли по 10 мкл раствора зонда флуоресцеин диацетата (50 мкг/мл) и снова инкубировали 15 мин при 37°C. Затем измеряли флуоресценцию клеток при $\lambda_{ex}=485$ нм и $\lambda_{em}=518$ нм. Измерение флуоресценции проводили с помощью флуоресцентного фотометра планшетного формата Fluoroskan Ascent (Thermo Labsystems, Финляндия). Все эксперименты повторяли дважды. Средние значения (m), стандартное отклонение (SD) и средняя ошибка (SE) эксперимента рассчитывались с помощью программы SigmaPlot 3.02 (Jandel Corporation, США). За 100% принимали флуоресценцию лунок, в которые вместо исследуемого вещества добавляли по 20 мкл физраствора. Результаты определения цитотоксической активности митилана и неомитилана представлены в таблице 1.

Таблица 1												
Определение цитотоксической активности неомитилана												
Конц. мкг/мл	1000,0	500,0	250,0	125,0	62,5	31,25	15,62	7,81	3,90	1,95	0,97	0,00
m, %	88,53	75,40	110,66	98,78	107,74	85,52	109,99	111,48	119,49	101,86	85,61	100
SD	10,20	4,96	7,59	1,81	8,55	3,39	7,52	7,90	4,60	2,60	2,66	
SE	5,89	2,86	4,38	1,04	4,93	1,95	4,34	4,56	2,65	1,50	1,54	

Как видно из представленной таблицы, неомитилан не обладает цитотоксической активностью в широком диапазоне доз от 0,97 до 1000 мкг/мл. Цитотоксическая активность изменялась в зависимости от добавленной концентрации в пределах 75.4-119.49%, что является допустимым в экспериментах *in vitro*.

Исследование аллергизирующих свойств

Оценку аллергизирующих свойств тест-препаратов неомитилана и препарата сравнения - митилана проводили в соответствии с общепринятой методикой [Любимов Б.И. и др. Методические указания по оценке аллергизирующих свойств фармакологических веществ. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. М., 2000. С.25-32].

Реакция гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ)

Мышей линии СВА весом 18-20 г. (самки) (по 10 животных в каждой группе) сенсibilизировали однократно подкожно (в основание хвоста) эмульсией тест-препаратов в полном адьюванте Фрейда (ПАФ) в объеме 60 мкл в дозе 300 мкг/мышь в растворе в ПАФ в соотношении 1:1. Для приготовления такой эмульсии использовали физраствор (ФР). Животным контрольной группы вводили вместо препарата 60 мкл ПАФ-ФР.

На 5 сутки в подушечку правой лапки мышей вводили 50 мкл раствора тест-препарата в ФР в дозе 300 мкг/мышь. Контрольным животным вводили 50 мкл ФР. Через 24 часа регистрировали ответ путем определения диаметра правой «опытной» и левой «контрольной» лап. Индекс реакции выражали в процентах прироста диаметра лапки, в которую вводили ПАФ с препаратом, по отношению к диаметру «контрольной» лапки. Результаты представлены в таблице 2.

Таблица 2	
Влияние неомитилана на реакцию гиперчувствительности замедленного типа	

Исследуемое соединение	Диаметр контрольной лапы (левая), мм	Диаметр опытной лапы (правая), мм	Индекс реакции	Кол-во животных
Контроль (ПАФ + ФР)	1,9500±0,0522	2,1200±0,0998	8,7	10
(ПАФ + митилан)	2,1700±0,0955	3,1900±0,1386*	47,1	10
(ПАФ + неомитилан)	2,1800±0,1052	2,2700±0,1309	4,12	10

* - p<0,05

Полученные результаты свидетельствуют о том, что неомитилан в исследуемой дозе практически не влияет на выраженность ГЗТ у мышей, в то время как препарат сравнения достоверно увеличивает индекс реакции замедленного типа на 47,1%. Следовательно, неомитилан в отличие от препарата сравнения не обладает провоспалительным действием, и не вызывает аллергической реакции замедленного типа.

Аллергические реакции немедленного типа. Конъюнктивальная проба Мышей линии СВА весом 18-20 г (самки) однократно сенсибилизировали путем внутрибрюшинного введения в дозе 300 мкг/мышь тест-препаратов (неомитилана и препарата сравнения - митилана). В каждой экспериментальной и контрольной группах было по 6 животных. Для постановки пробы 1 каплю водного раствора препарата в дозе 300 мкг/мышь вводили глазной пипеткой под верхнее веко подопытным и контрольным животным. Через 15 мин учитывали реакцию и оценивали ее визуально по следующей шкале в баллах:

0 - отсутствие эффекта;

1 - легкое покраснение слезного протока;

2 - покраснение слезного протока и склеры в направлении к роговице;

3 - покраснение всей конъюнктивы и склеры.

Результаты представлены в таблице 3.

Таблица 3				
Влияние неомитилана на аллергические реакции немедленного типа. Конъюнктивальная проба, баллы				
Исследуемое соединение	0	1	2	3
Контроль	+	-	-	-
	+	-	-	-
	+	-	-	-
	+	-	-	-
	+	-	-	-
	+	-	-	-
Митилан, 300 мкг/мышь	-	+	-	-
	+	-	-	-
	+	-	-	-
	+	-	-	-
	+	-	-	-
	+	-	-	-
Неомитилан, 300 мкг/мышь	+	+	-	-
	+	-	-	-
	+	-	-	-
	+	-	-	-
	+	-	-	-
	+	-	-	-

Исследования показали, что неомитилан, а также препарат сравнения практически не оказывают никакого влияния на аллергическую реакцию немедленного типа у мышей (конъюнктивальная проба).

Исследование иммуномодулирующих свойств

Определение лизосомальной активности

Одним из проявлений иммуномодулирующей активности биологически активных веществ является их влияние на функции фагоцитирующих клеток и, в частности, на лизосомальную активность макрофагов [Фрейдлин И.С. и др. Уровень содержания лизосом в мононуклеарных фагоцитах как показатель функциональной активности. Структура и функции лизосом // Тез. докл. Всесоюзн. симп. Новосибирск. 1980. С.182-183]. При стимулировании лизосомальной активности происходит увеличение числа лизосом, увеличение их размера, а так же их закисление, что приводит к активированию ряда лизосомальных ферментов. Использование флуоресцентного зонда акридинового оранжевого (АО), который проникает в лизосомы живых клеток и накапливается там, позволяет оценить физиологическое состояние этих органелл путем регистрации интенсивности флуоресценции локализованного в лизосомах АО. Увеличение интенсивности флуоресценции зонда в оранжево-красной области свидетельствует о стимуляции макрофагов.

Для определения лизосомальной активности получали макрофаги из перитонеальной жидкости мышей линии СВА [Адамс Р. Методы культуры клеток для биохимиков. М.: Мир, 1983. 264 с.]; (3 штуки - контроль, вводили только физраствор, 3 штуки - вводили митилан в разных концентрациях, 3 штуки - вводили неомитилан в разных концентрациях). Через 4 суток мышей забивали методом перивисцеральной дислокации, в брюшную полость немедленно вводили 2 мл физраствора и интенсивно пальпировали брюшную полость в течение 1-2 мин. Затем с помощью шприца собирали перитонеальную жидкость и переносили ее в специальные камеры для анализа изображения клеток. Камеры с жидкостью инкубировали в термостате при 37°C в течение 1 часа до полного прикрепления перитонеальных макрофагов ко дну камеры. Затем клеточный монослой трижды промывали физраствором и наносили 200 мкл раствора флуоресцентного зонда Акридиновый оранжевый (10 мкМ конечная концентрация) в физрастворе и оставляли камеры в термостате при 37 С на 30 мин. Затем клеточный монослой трижды отмывали физраствором и проводили измерение интенсивности флуоресценции клеток в монослое на флуоресцентном микроцитометре Axiovert 200 (Zeiss, Германия) с использованием системы регистрации флуоресцентного изображения клеток (Cairn Research Ltd., Англия). Клетки облучали светом длиной волны $\lambda_{ex}=488$ нм, флуоресценцию регистрировали при $\lambda_{em}=520$ нм.

Интенсивность флуоресценции изображений случайно выбранных клеток и оценку лизосомальной активности в клетках осуществляли инструментальными средствами программы AQM Advance 6 (Kinetic Imaging Ltd., Англия). Все эксперименты выполняли в трех повторах, среднее значение и стандартную ошибку рассчитывали с помощью программного обеспечения SigmaPlot 3.02 (Jandel Scientific, San Rafeal, CA). Лизосомальную активность рассчитывали, принимая за 100% активность макрофагов контрольной группы мышей. Результаты представлены в таблице 4.

Таблица 4			
Определение лизосомальной активности неомитилана			
Исследуемое соединение	Кол-во животных в группе	Режим применения	Лизосомальная активность, %
Контроль	3	300 мкг/мышь	100
Митилан	3	300 мкг/мышь	142,16
Неомитилан	3	300 мкг/мышь	304,26

Установлено статистически достоверное увеличение лизосомальной активности у перитонеальных макрофагов мышей на 4 день после инъекции тест-препаратов в

дозе 300 мкг/мышь. Было показано, что под действием митилана лизосомальная активность макрофагов увеличивалась примерно на 40% по сравнению с контролем. В случае использования неомитилана в той же дозе, что и митилана, лизосомальная активность макрофагов увеличивалась примерно в 3 раза по сравнению с макрофагами контрольных мышей и более чем в 2 раза по сравнению с активностью под действием митилана.

Определение активных форм кислорода

Формирование активных форм кислорода (АФК) - важный защитный механизм, лежащий в основе неспецифического иммунитета. АФК выделяются при инфекционных и иных воспалительных процессах в ходе активации фагоцитирующих клеток (нейтрофилы, макрофаги, моноциты, эозинофилы) [Emmendorffer S.F. et. al. A fast easy method to determine the production of reactive oxygene intermediates by human and murine phagocytes using dihydrorodamine 123 // J. Immunol. Meth. 1990. V.131. P.269-275].

Фагоцитоз приводит к многократному увеличению содержания АФК в этих клетках с одновременным повышением потребления кислорода в 20 и более раз ("дыхательный взрыв"). Общеизвестен и хорошо изучен механизм "дыхательного взрыва" фагоцитов, являющийся главным компонентом неспецифической иммунной защиты организма. Для оценки уровня продукции АФК используют флуоресцентный зонд дихлорфлуоресцин диацетата (DCFH-DA), который проникает в макрофаги и гидролизуется, превращаясь в нефлуоресцентный дихлорфлуоресцин (DCFH). В свою очередь DCFH в цитоплазме под воздействием АФК подвергается дальнейшему окислению с образованием ярко флуоресцирующего продукта DCF. Следовательно, увеличение флуоресценции макрофагов в зеленой области отражает увеличение концентрации активных форм кислорода в них.

Для определения влияния неомитилана на формирование активных форм кислорода получали макрофаги из перитонеальной жидкости мышей линии СВА (3 штуки - контроль, вводили только физраствор, 3 штуки - вводили препарат сравнения в разных концентрациях, 3 штуки - вводили неомитилан в разных концентрациях). Через 4 суток мышей забивали методом перивисцеральной дислокации, в брюшную полость немедленно вводили 2 мл физраствора и интенсивно пальпировали брюшную полость в течение 1-2 мин. Затем с помощью шприца собирали перитонеальную жидкость и переносили ее в специальные камеры для анализа изображения клеток. Камеры с жидкостью инкубировали в термостате при 37°C в течение 1 часа до полного прикрепления перитонеальных макрофагов ко дну камеры. Затем клеточный монослой трижды промывали физраствором и наносили 200 мкл раствора флуоресцентного зонда дихлорофлуоресцин диацетат (10 мкМ конечная концентрация) в физрастворе и оставляли камеры в термостате при 37 С на 10 мин. Затем клеточный монослой трижды отмывали физраствором, но без флуоресцентного зонда. После чего камеры с клетками монтировали на предметном столе флуоресцентного микроцитометра Axiovert 200 (Zeiss, Германия) и проводили измерение интенсивности флуоресценции клеток в монослое с использованием системы регистрации флуоресцентного изображения клеток (Cairn Research Ltd., Англия). Клетки облучали светом длиной волны $\lambda_{ex}=488$ нм, флуоресценцию регистрировали при $\lambda_{em}=520$ нм.

Интенсивность флуоресценции 300 случайно выбранных изображений клеток анализировали с помощью пакета программ AQM Advance 6 (Kinetic Imaging Ltd., UK). Все эксперименты выполняли в трех повторах, среднее значение и стандартную ошибку рассчитывали с помощью программного обеспечения SigmaPlot 3.02 (Jandel

Scientific, San Rafeal, CA). Подсчет АФК проводили, принимая за 100% количество АФК, продуцируемых макрофагами контрольной группы мышей. Результаты представлены в таблице 5.

5

Таблица 5			
Определение влияния неомитилана на формирование АФК			
Исследуемое соединение	Кол-во животных в группе	Режим применения	Формирование АФК, %
Контроль	3	300 мкг/мышь	100
Митилан	3	300 мкг/мышь	200,11
10 Неомитилан	3	300 мкг/мышь	148,15

Как видно из представленной таблицы, при внутрибрюшинной инъекции мышам биогликанов митилана и неомитилана в дозе 300 мкг/мышь наблюдается статистически достоверное увеличение активных форм кислорода в 2 и в 1,5 раза, соответственно, по сравнению с контролем.

Определение фагоцитарной активности

Определение фагоцитарной активности тест-препаратов проводили в соответствии с общепринятой методикой [Хаитов Р.М. и др. Методические указания по изучению иммунотропной активности фармакологических веществ. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. М., 2000. С.257-263].

Мечение бактерий. Для постановки фагоцитоза и реакции внутриклеточного киллинга использовали бактерии *St.aureus*, меченые ФИТЦ. Суточную культуру *St.aureus*, смывали фосфатно-солевым буфером (ФСБ). Для фагоцитоза бактерии убивали нагреванием на водяной бане при 100°C в течение 40 мин. Стафилококк дезинтегрировали с помощью ультразвука на УЗ-бане (51 кГц, 90W) 2 часа. Осаждали при 1000 g 25 мин и отмывали 10 мл ФСБ. Второй раз отмывку проводили 0,1 М карбонатно-бикарбонатным буфером, pH 9,5. Ресуспендировали в этом же буфере и по стандарту мутности концентрацию бактерий доводили до 100 млн/мл. К суспензии добавляли свежеприготовленный раствор ФИТЦ: для убитых бактерий - 0,1 мг/мл, для живых - 1 мг/мл. Для мечения стафилококка его выдерживали с ФИТЦ в течение 12-16 часов при +4°C в темноте. Затем бактерии трижды отмывали ФСБ (режим центрифугирования - 1000 g 25 мин), ресуспендировали в ФСБ с добавлением 5% эмбриональной телячьей сыворотки и 5% ДМСО. Концентрацию бактерий доводили до 100 млн/мл. Аликвоты хранили при -70°C.

Получение макрофагов. Макрофаги получали из перитонеальной жидкости мышей линии BALB/C. Мышей забивали методом перивисцеральной дислокации, в брюшную полость немедленно вводили 2 мл ФСБ (pH 7,4) и интенсивно пальпировали брюшную полость в течение 1-2 мин. Затем с помощью шприца собирали перитонеальную жидкость и переносили ее в пластиковые чашки Петри. Чашки с жидкостью инкубировали в термостате при 37°C в течение 1 часа до полного прикрепления перитонеальных макрофагов ко дну чашек. Затем клеточный монослой трижды промывали ФСБ (pH 7,4) и снимали с поверхности чашек с помощью скрепера. Рабочая концентрация клеток составляла обычно $2-5 \times 10^6$ клеток/мл.

Оценка фагоцитоза. Анализ фагоцитирующей активности перитонеальных мышинных макрофагов проводили согласно протоколу компании Молекуляр Пробс [Molecular Probes protocol for the Vybrant™ Phagocytosis Assay Kit // Haugland R.P. Handbook of fluorescent probes and research products. 9th Edition, J.Gregory ed., Molecular Probes Inc., 2002].

Суспензию макрофагов в концентрации 2×10^6 клеток/мл в ФСБ (рН 7,4) по 200 мкл вносили в лунки 96-луночной плоскодонной микропланшеты, в которых содержалось по 20 мкл раствора тестируемых соединений в различных концентрациях. В эксперимент были включены отрицательные контроли (лунки, не содержащие макрофаги) и положительные контроли (лунки, не содержащие тестируемые соединения). Заполненную планшету помещали в инкубатор на 1 час при 37°C для адгезии макрофагов и инкубирования с тест-веществами. Затем среду удаляли путем вакуумной аспирации и в каждую лунку добавляли по 100 мкл суспензии FITC-меченных бактерий в концентрации 1×10^7 бактерий/мл и планшету помещали в инкубатор еще на 2 часа. Потом среду, содержащую бактерии, удаляли вакуумной аспирацией, а к лункам добавляли по 100 мкл раствора трипанового синего в ФСБ (конечная концентрация 0,25 мг/мл). Через 1 мин инкубирования при комнатной температуре раствор удаляли и считали флуоресценцию клеток с помощью флуоресцентного фотометра планшетного формата Fluoroscan Ascent ("ThermoLabsystems", Finland) при длине волны возбуждения 485 нм и длине волны эмиссии 518 нм.

Эффект соединений на фагоцитарную активность макрофагов (%) оценивали по следующей формуле:

$$\% = A/A_1 \times 100\%,$$

где A - разница усредненной интенсивности флуоресценции клеток, инкубируемых с тестируемыми соединениями и усредненной интенсивности флуоресценции отрицательного контроля. Это значение характеризует фагоцитоз в ответ на действие эффектора.

A_1 - разница между усредненной интенсивностью флуоресценции положительного и отрицательного контроля. Это значение характеризует фагоцитоз в нормальных условиях в отсутствие эффектора.

Тестируемые соединения анализировались в различных концентрациях: 1 мг/мл, 100 мкг/мл; 10 мкг/мл; 1 мкг/мл; 0,1 мкг/мл в 4-х повторностях для каждой концентрации.

Показано, что тестируемые соединения способны стимулировать фагоцитоз перитонеальных мышинных макрофагов *in vitro*. Максимальной стимулирующей концентрацией является 10 мкг/мл, при которой за 2 часа инкубирования происходит 25-30%-ная стимуляция фагоцитоза.

Исследование ранозаживляющих свойств

Репаративные свойства заявляемого средства и прототипа изучены на моделях лоскутных и ожоговых ран. Нанесение ожоговой травмы и получение лоскутных ран проводили в соответствии с существующими требованиями проведения экспериментов на животных.

Для определения ранозаживляющей активности новых соединений общепринятым считается использование мазевой основы, включающей ланолин и вазелин в соотношении 1:3 [Раны и раневая инфекция. Руководство для врачей (под редакцией Кузина М.И., Костюченко Б.М.). М.: «Медицина». 1990. 592 с.]. Такие мазевые основы применяются для приготовления мазей поверхностного действия, которые должны оставаться длительное время на месте нанесения в пределах эпидермиса, медленно высвобождая лекарственные вещества.

В качестве положительного контроля использовали мазь метилурациловую 10% (ФС 42-1993-96) (МУМ). Метилурацил - пиримидиновое производное, широко используемое для профилактики и лечения нарушений репаративных процессов в организме и нормализации его защитно-приспособительных реакций. Препарат, также

приготовленный на ланолин-вазелиновой основе, дает местный противовоспалительный эффект, нормализует обменные процессы в тканях, способен активировать местный фагоцитоз и поэтому стимулирует процессы заживления ран. Применяется в виде 10%-ной мази на жировой основе. Мазь не обладает прямой антимикробной активностью, в связи с чем подавление в вегетирующей ране вторичной инфекции обеспечивается косвенно - за счет местных реакций иммунитета. Недостатком МУМ является слабое проявление противовоспалительной активности и узкая направленность действия на стимуляцию процессов пролиферации в гранулирующей ткани [Раны и раневая инфекция. Руководство для врачей (под редакцией Кузина М.И., Костюченко Б.М.). М.: «Медицина». 1990. 592 с.]. Оценка ранозаживляющей активности исследуемых препаратов была проведена на беспатогенных мышах линии CD1, которым наносили термические и лоскутные раны согласно общепринятой методике [Билич Г.Л., Колла И.Э. Фармакологическая регуляция регенераторных процессов в эксперименте и клинике. Горький. 1978. С.10-20].

Для получения ожоговых ран на боковой поверхности кожи беспатогенных мышей выстригали шерсть. Медный стержень с плоским торцом диаметром около 6 мм, нагретый в течение 30 сек на кипящей водяной бане, на 5-6 сек прижимали торцом к выбритому участку кожи животного. Для получения лоскутных ран на боковой поверхности кожи беспатогенных мышей выстригали шерсть. Анатомическим пинцетом оттягивали кожную складку, зажимая в пинцет около 1 мм кожи, после чего срезали кожу непосредственно под концами пинцета с помощью глазных ножниц на участке 0,25 см².

Ланолин-вазелиновые мази на основе неомитилана (1%), митилана (1%) и метилурациловую мазь (10%) наносили на раневую поверхность (0,12 г/см²), равномерно распределяя по всей пораженной поверхности. В качестве контроля использовали мышей с ранами, не получавших мазь (без воздействия). Каждая экспериментальная и контрольная группа включала по 5 животных. Препараты применяли в течение 4-х дней. Критериями эффективности лечения приняты клинические данные (формирование струпа, состояние струпа, наличие периферической эпителизации, отечность и гиперемия краев раны, заживление, степень восстановления кожного покрова). Характер течения репаративного процесса оценивали, измеряя площади раневой поверхности в различные сроки эксперимента.

Для измерения размеров к ране прикладывали покровное стекло и переносили (срисовывали) на него контуры раны. Стекла с нанесенными контурами отцифровывали с помощью сканера в графический файл формата «BMP». Площади ран определяли с помощью программы Adobe Photoshop CS (version 8.0): устанавливали экранную решетку со стороной квадрата 0,25 мм², а затем подсчитывали количество квадратов, охватываемых контуром раны. Максимальный срок наблюдения составлял 10 дней. Ранозаживляющую эффективность рассчитывали по формуле

$$X\% = 100 - (Ск. \times 100 / Сис.), \text{ где}$$

X - заживление раны, %;

Ск. - площадь конечной раны;

Сис. - площадь исходной раны.

Средние значения (m), стандартное отклонение (SD) рассчитывались с помощью программы SigmaPlot 3.02 (Jandel Corporation, США).

При оценке течения раневого процесса большое значение имеет объективная

классификация как стадии заживления, так и характера самой раны. При анализе раневого процесса использовалась классификация, предложенная Кузиным М.И., согласно которой этот процесс можно разделить на три фазы: I - фаза воспаления, которая делится на период сосудистых изменений и период очищения раны от некротических (погибших) тканей; II - фаза регенерации, образования и созревания грануляционной ткани; III - фаза реорганизация рубца и эпителизации [Раны и раневая инфекция. Руководство для врачей (под редакцией Кузина М.И., Костюченко Б.М.). М.: «Медицина». 1990. 592 с.]

Результаты экспериментов представлены в таблицах 6 и 7.

Сравнительная оценка действия исследуемых мазей на процесс заживления ожоговых ран				
Исследуемые соединения	Кол-во животных в группе	Режим применения	5 день	10 день
			Заживление, % (m±SD)	Заживление, % (m±SD)
Контроль	5	-	-	46,1±7,4
МУМ	5	4 дня	-	31,8±11,4
Мазь с митиланом	5	4 дня	-	69,1±8,9
Мазь с неомитиланом	5	4 дня	11,8±1,1	76,4±5,3

Наибольшая ранозаживляющая активность на модели ожоговых ран наблюдалась при лечебном применении 1%-ной мази с неомитиланом (заявляемый препарат) как на ранних стадиях (на 5 день наблюдения), так и на III фазе течения раневого процесса. На 5-е сутки эксперимента площадь ожоговой раны у мышей сократилась на 11,8%, в то время как в группах животных, леченных мазью с митиланом (препарат сравнения) и МУМ, заживления не наблюдали. На 10-е сутки лечения отмечено, что мазь с неомитиланом и мазь с митиланом обладают достаточно выраженным и относительно сходным действием на скорость заживления ожоговых ран. Как видно из данных, представленных в таблице 6, мазь с неомитиланом эффективнее мази с митиланом и эффективнее МУМ в 2,4 раза.

Сравнительная оценка действия исследуемых мазей на заживление лоскутных ран				
Исследуемые соединения	Кол-во животных в группе	Режим применения	5 день	10 день
			Заживление, % (m±SD)	Заживление, % (m±SD)
Контроль	5	-	28,6±2,3	83,9±0,8
МУМ	5	4 дня	37,3±2,0	91,4±2,1
Мазь с митиланом	5	4 дня	43,8±2,1	92,8±1,7
Мазь с неомитиланом	5	4 дня	46,5±3,3	94,2±1,8

На 5-е сутки лечения наибольшая ранозаживляющая активность на модели лоскутных ран отмечена для мази с неомитиланом. Использование мазей на основе митилана и неомитилана эффективнее использования МУМ (препарат сравнения) на 17% и 25% соответственно. На 10-е сутки лечения значительной разницы в заживлении ран не наблюдали.

Полученные результаты на моделях лоскутных ран и термического ожога свидетельствуют о выраженной ранозаживляющей активности заявляемого средства на ранних стадиях течения раневого процесса. После нанесения раны образование струпа в ранах у животных, которым накладывали аппликации мази с неомитилановой мазью, происходило заметно быстрее (уже на 5-й день) по сравнению с митилановой и метилурациловой мазями. В дальнейшем в группе животных, проходивших лечение мазью с неомитиланом, регистрировали четкое ускорение

эпителизации раневой поверхности и восстановления кожного покрова.

Исследование противовоспалительных свойств неомитилана

Одним из патогенетических факторов, поддерживающим воспаление и способствующим его хронизации, является пероксидное окисление липидов (ПОЛ) [Кокосов А.Н. и др. Перекисное окисление липидов и гемостаз на этапах формирования хронического бронхита и бронхиальной астмы // Пульмонология. 1995. №1. С.38-40].

В нормальных условиях во всех клетках свободнорадикальные реакции ПОЛ протекают на стационарно низком уровне, а при воспалительных процессах наблюдается их усиление. Конечные продукты окисления приводят к образованию биологически активных альдегидов, в частности, малонового диальдегида (МДА), которые участвуют в дальнейших процессах воспаления. Показатель МДА является одной из прогностически значимых величин при изучении процессов ПОЛ.

Кроме того, показателями воспалительных процессов в организме являются повышенные уровни метаболитов окиси азота (NO). В респираторном тракте NO продуцируется конституционной NO-синтазой (NOS) эндотелия легочных сосудов, нейронов, эпителиальных клеток, а также индуцибельной NOS (iNOS) [Невзорова В.А. и др. Роль окиси азота в регуляции легочных функций // Тер. архив. 1997. №3. С.68-73].

Влияние неомитилана на активность NO-синтазы (NOS) и процессы ПОЛ в легких изучали на курящих добровольцах (3 человека) после ингаляции его растворов в дозе 3 и 10 мг на человека однократно. После ингаляции 5 мл соответствующего раствора с помощью ультразвукового ингалятора «Ротор» (Ротор, Барнаул) определяли уровень нитрит-иона и малонового диальдегида (в относительных единицах к контролю) в конденсате выдыхаемого воздуха в течение первых суток. У всех курящих добровольцев, у которых вследствие патогенного воздействия табачного дыма повышен уровень ПОЛ и активность NOS в среднем в 2-2,5 раза по сравнению с некурящими, в течение первых 3-5 часов наблюдалось достоверное снижение уровня этих показателей в конденсате выдыхаемого воздуха. При ингаляции в дозе 3 и 10 мг концентрация нитрит-иона уменьшалась на 35% и 75%, а уровень МДА - на 40% и 70% соответственно. Эффект снижения отмечается и к завершению первых суток после ингаляции неомитилана. Следует отметить, что препарат неомитилан при таком введении (при ингаляции) не обладает пирогенным эффектом, колебания температуры тела не превышают физиологических.

Таким образом, предварительные результаты указывают на то, что неомитилан обладает противовоспалительным действием. Это открывает перспективы его использования для снижения патофизиологического действия табачного дыма и других неблагоприятных компонентов окружающей среды, которые попадают в легкие человека.

Формула изобретения

Средство, обладающее иммуномодулирующим, противовоспалительным и ранозаживляющим действием, характеризующееся тем, что оно представляет собой 1,4; 1,6- α -D-глюкан, который содержит глюкозу - не менее 98% и белок - не более 1,5%, имеет интенсивные сигналы в спектре ^{13}C -ЯМР при 100,3; 99,2; 77,7; 68,5 и 61,05 м.д., удельное вращение $[\alpha]_{\text{D}}^{20} +160^{\circ}\text{C}$, имеет молекулярную массу 2 MDa и получено из экстракта, образующегося при нагревании мидий в воде в течение 1,0-2,0 ч при 90-95 $^{\circ}\text{C}$, с последующей его очисткой путем отделения примесей осаждением, диализом на полых волокнах и хроматографией на анионите, предпочтительно на

анионите АН-31.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50