



ОПИСАНИЕ КЪМ ПАТЕНТ

ЗА

ИЗОБРЕТЕНИЕ

ПАТЕНТНО ВЕДОМСТВО

(21) Регистров № 99445
(22) Заявено на 20.02.95
(24) Начало на действие
на патента от: 20.07.93

Приоритетни данни

(31) 5055549 (32) 21.07.92 (33) RU
93030289 17.12.92 UA

(41) Публикувана заявка в
бюлетин № 3 на 29.03.96
(45) Отпечатано на 30.06.98
(46) Публикувано в бюлетин № 3
на 31.03.98
(56) Информационни източници:
FR 2413912; US 4455302
SU 1442064; EP 0106285
EP 0157427
(62) Разделена заявка от рег. №

(73), (72) Патентоприетжател(и)
и изобретател(и):
АЛЕКСАНДР НИКОЛАЕВИЧ
НИКОЛАЕНКО, КИЕВ (UA)

(74) Представител по индустриална
собственост:
Д -р Емил Габриел Бенатов, 1113 София,
ул. "Люлякова градина" бл. 36 Б

(86) № и дата на РСТ заявка:
PCT/UA93/00004, 20.07.93

(87) № и дата на РСТ публикация:
WO94/02105, 03.02.94

**(54) БИОЛОГИЧНО АКТИВНО СРЕДСТВО С ИМУНОМОДУЛИРАЩО СВОЙСТВО, МЕТОД
ЗА ПОЛУЧАВАНЕТО МУ И ЛЕКАРСТВЕН ПРЕПАРАТ НА НЕГОВА ОСНОВА**

(57) Биологично активното средство (БАС) на основата на органични съединения от компоненти на клетъчни мембрани (ККМ) от хомогенизирана животинска тъкан съдържа в състава си термостабилни, нискомолекулни модифицирани компоненти на клетъчните мембрани с антигенна структура, модифицирани при процесите на ембриогенеза, и/или на пролиферация, и/или на диференциация на клетките, и/или на патология, предшестваща и/или съпътстваща регенерацията и/или репарацията на тъканта. Методът за получаване на БАС включва смилане и хомогенизиране на суровината от животинска тъкан. От хомогената се отделя утайката, съдържаща клетъчни мембрани (КМ), от която след ресуспендиране се получава ККМ. Хомогенатът на модифицираната животинска тъкан се пречиства от неразрушени елементи на тъканта чрез филтриране и/или центрофугиране с ускорение 150 - 250 g в продължение на 10 - 15 min и се отделя утайката с КМ, която се хидролизира. Продуктите от хидролизата се филтрират и/или центрофугират при ускорение над 1500 g в продължение на 20 до 40 min и се отделя супернатанта от продукти на хидролизата, съдържаща ККМ като целеви продукт. Препаратът за нормализиране на физиологичното състояние на организма на човека и животните съдържа като БАС в състава си термостабилни, нискомолекулни модифицирани компоненти на ККМ от 0,001 до 85,0 % тегл. и от 15,0 до 99,999 % тегл. пълнител. По метода за нормализиране на физиологичното състояние на човека и животните препаратът се въвежда в организма.

40 претенции, 1 фигура

**(54) БИОЛОГИЧНО АКТИВНО СРЕДСТВО С ИМУНОМОДУЛИРАЩО СВОЙСТВО, МЕТОД
ЗА ПОЛУЧАВАНЕТО МУ И ЛЕКАРСТВЕН ПРЕПАРАТ НА НЕГОВАТА ОСНОВА**

ОБЛАСТ НА ТЕХНИКАТА

Групата изобретения се отнася към химико-фармацевтичната промишленост, а именно към областта за получаване на биологично активни средства, имащи имуномодулиращо действие, за използване в медицината и ветеринарното дело с цел да се нормализира физиологичното състояние на организма на човека и животните, по-специално за възстановяване на функционалната активност на органите и тъканите.

Биологичното активно средство съгласно изобретението е от веществата с животински произход и включва в себе си органични съединения.

Различните патологични нарушения в организма на човека и животните предизвикват отклонения от нормата на параметрите на физиологичното състояние. В тези случаи лечебното въздействие върху организма, включително и профилактичното въздействие, се състои в стабилизиране, тоест в поддържане на указаните параметри в норма или (при отклоняването им от нормата) в такова въздействие върху организма, при което тези параметри се нормализират.

Групата изобретения касае биологично активно средство, методът за неговото получаване и лекарствен препарат на основата на биологично активното средство, който се използва за нормализиране на физиологичното състояние на организма.

ПРЕДШЕСТВАЩО СЪСТОЯНИЕ НА ТЕХНИКАТА

Нормализирането на физиологичното състояние на организма на човека и животните може да се осъществява в две направления:

първо - чрез непосредствено въздействие на патологията;

второ - чрез непряко въздействие на системите, органите и тъканите в организма, отговарящи за поддържането в норма на параметрите на хомеостаза.

Въвеждането на хормонални препарати, медиаторите, растежните фактори, химиотерапията и други подобни средства осигуряват непосредствено въздействие на клетките-мишени чрез рецепция. Например при лечението на диабета се въвежда инсулин, запълващ функционалната недостатъчност на подстомашната жлеза; при нарушаване на функционалната активност на нервната система се въвеждат нервомедиатори, помагачи за нормализиране на праговата чувствителност на невроните и съответно за подобряване на предаването на нервните импулси; при нарушаване на функционалната активност на имунната система в организма се използват имуномедиатори, корелиращи имунната реакция и т.н.

При непрякото въздействие над организма лечението на заболяванията се осигурява чрез мобилизиране на вътрешните ресурси на организма. Така при протичането на процесите, свързани с регенерирането на органите и тъканите, с тяхната рехабилитация или с възстановяването на функциите им, а така също и при възпалителни и инфекциозни процеси, се стимулира имунната система на организма. Благодарение на това се осигурява подобряване на имунното и като следствие - и на общото състояние на организма.

Известно е биологично активно средство на база зародишна тъкан, което притежава имуномодулиращо свойство, възстановяващо физиологичното състояние на организма и регулиращо обмяната на клетките (FR-A-2413912). Това биологично активно средство (понататък в текста БАС) е изпълнено на база инградиенти от смляна и хомогенизирана животинска тъкан, отделена от зародиш, в смес с физиологичен разтвор.

Поради наличието на имуномодулиращ фактор в състава на това средство то има сравнително високо имуномодулиращо свойство, благодарение на което неговото използване осигурява нормализиране на физиологичното състояние на организма, включително и повишаване на продуктивността на животните с 5-15% в сравнение с контролната група.

Ефективността на известното БАС е все пак недостатъчна поради това, че едновременно с имуномодулиращите фактори то съдържа в състава си и имунодепресанти, които пречат за пълната реализация на имуномодулиращия ефект. Всъщност имуномодулиращото свойство на това средство е сумарен резултат, който се осигурява от едновременното присъствие в него на имуностимулиращи фактори и депресанти. Поради тази причина фактически специфичната активност на известното БАС, зависеща от съотношението на концентрациите на

имуностимулиращите фактори и депресантите, е сравнително ниска поради значителната концентрация на депресантите в неговия състав.

Друг недостатък на известното БАС е повишеното съдържание в състава му на високомолекулни съединения, които са имуногенни, водещи до появата на странични имунни реакции (алергия, свръхчувствителност от забавен тип и др.).

В значителна степен недостатъците на гореописаното БАС зависят от метода за неговото получаване, в който технологичният процес завършва с операция по смилане и хомогенизация на суровина от животинска тъкан, което води до присъствието на значително количество депресанти и високомолекулни съединения в неговия състав.

Известно е също БАС, което притежава имуномодулиращо свойство за нормализиране на физиологичното състояние на организма и е изпълнено на базата на продукти от хидролизата на инградиентите на смляна суровина от животинска тъкан, за предпочитане взета от недоразвити животни. Известни са и методи за получаването на това БАС и за използването му при зарастването на травмирани участъци от тялото (US-A-4455302). В неговия състав влизат разтворими полипептиди, аминокиселини и минерални вещества, получени в резултат на хидролиза на тъканите.

Това средство има висока ефективност при нормализирането на параметрите на физиологичното състояние на организма. Това е така, тъй като известното БАС се характеризира с високо съотношение на ефектите за имуностимулиране и имуноинхибиране, от една страна, поради по-високото съдържание в състава му на имуностимулиращи фактори за сметка на присъствието на продуктите от хидролизата, а, от друга страна - във връзка със значителното намаляване на количеството на високомолекулните съединения по време на същия процес на хидролиза.

Но ефективността на описаното БАС е все пак недостатъчна поради съдържащото се в състава му относително голямо количество баластни вещества и имунодепресанти. Освен това известното БАС също може да предизвиква странични ефекти, проявяващи се при използването му (алергия и др.) поради това, че в състава му също присъстват високомолекулни съединения, които са имуногенни и са с молекулно тегло над 10 kDa.

Недостатък на известното БАС е и това, че съставът на полученият краен продукт е непостоянен и се колебае от партида на партида, поради което е затруднена неговата стандартизация.

Свойствата на известното БАС и преди всичко неговата имуномодулираща активност са пряко свързани с метода за получаването му, който включва хидролиза на инградиентите на промитата и смляна суровина от животинска тъкан, центрофугиране на хидролизата, филтриране и отделяне на целевия продукт, като хидролизата се извършва в разтвор на разрежена слаба органична киселина при рН 3,6 - 6,5 и температура около 68°C, а за суровина се използват крака на недоразвити домашни птици на не повече от 9-седмична възраст.

Крайният продукт се отделя във вид на прах или гел, който при използване се налага върху повредените участъци от тялото.

Използваната като суровина животинска тъкан, съдържаща сравнително голямо количество имунодепресанти, и невъзможността да се подобри съставът на целевия продукт чрез използваните в известния метод операции съществено снижават ефективността на полученото БАС.

Следва да се отчита, че съдържащите се в тъканните препарати компоненти от екстракта в голяма степен са стимулатори на функционалната активност на органите и тъканите; въздействието на които основно е едностранно, т.е. действието на БАС зависи само от неговата концентрация в организма и не зависи от физическия статус на организма. Това изисква в процеса на лечение строго съблюдаване на дозите от лекарствен препарат на основата на известното БАС.

Методът за неговото получаване се състои в смилане и хомогенизиране на суровина от животинска тъкан, последващо отделяне на неразтворимите съединения и използване на екстрахирани вещества като целеви продукт (EP-A-0249563).

Посочените недостатъци са частично отстранени в известните БАС, чийто ефект на действие корелира с физиологичния статус на организма и при неговото нормализиране действието на такова БАС се прекратява, т.е. появява се ефект на двустранна връзка. Затова са много интересни известните БАС на основата на компонентите на клетъчни мембрани от жива тъкан, които са способни да реагират на изменението на параметрите на хомеостаза на организма (SU-A-1442064, EP-A-0106285, EP-A-0157427).

В тези препарати, получени като ваксини, се използват специфични антигени, които се появяват на повърхността на клетките при някои паталогични процеси, а именно при процесите на неоплазия, поради което използването на ваксини е насочено към елиминиране на тази патология. Ефективността на действието на посочените лекарствени препарати на основата на БАС пряко зависи от количеството на представените в организма антигени, т.е. от тяхната концентрация в организма, и се прекратява при елиминиране на неоплазията, което показва наличието на саморегулираща се двустранна връзка.

Недостатък на известните лекарствени препарати е тяхната висока специфичност към изходната патология, т.е. тесният им диапазон на действие, поради което те принципно не могат да имат разширено използване за възстановяване (нормализиране) на параметрите на физиологичното състояние на организма.

Друг недостатък е, че тези ваксини се приемат само за елиминиране на патология и само косвено са насочени за нормализиране на физическото състояние на организма. Освен това недостатък е и това, че известните БАС не активират регенераторни и възстановителни процеси. Такива БАС трябва да отговарят на повишени изисквания за чистота (хомогенност) на получавания антиген, за да се избягват страничните ефекти.

Известните БАС се получават по известен метод, съгласно който животинската суровина се смила и хомогенизира със следващо отделяне от хомогената на клетъчните мембрани от животинските тъкани, от които след солубилизация се получават компонентите на клетъчните мембрани като гликопротеини (SU-A-1442064, EP-A-0106285, EP-A-0157427).

Предимство на известния метод е, че той позволява да се получат високоспецифични въглеродсъдържащи компоненти от клетъчните мембрани, способни да предизвикват ответна реакция на имунната система в организма, когато присъства тумороспецифичен антиген.

Към предимствата на известния метод следва да се отнесе и това, че той позволява да се отделят въглеродсъдържащите компоненти на клетъчните мембрани с помощта на специфични лектини, които са способни да се свързват с определени крайни въглеродни остатъци.

Но при реализирането на операциите в известния метод клетъчните мембрани се подлагат на солубилизация чрез детергенти,

обикновено с невронна природа, като например детергента Тритон Х-100, които трудно се отстраняват в следващите операции на метода и които сами предизвикват странични ефекти при използването на средството в клиника.

Недостатък на известния метод е и това, че той е сравнително нископроизводителен и много трудоемък, а така също зависи от наличието на специфични ракови тъкани, които се използват като изходна суровина.

Най-близко до заявеното е БАС с имуномодулиращо свойство за нормализиране на физиологичното състояние на организма на основата на представени органични съединения от компоненти на клетъчни мембрани от смляна и хомогенизирана животинска тъкан (ЕР-А-0318030).

В сравнение с гореизброените средства-аналози известното лекарствено средство има по-висока ефективност, характеризира се с повишаване от 62% на килърната активност по отношение на специфичните туморни клетки спрямо контролата, което се дължи на това, че БАС-аналогът е маркер на ръста на злокачествените клетки и специфично активира килърната активност, насочена към елиминиране на такива клетки.

Но известното БАС има всички гореизброени недостатъци, характерни за аналозите, а именно:

- висока специфичност към изходната патология (неоплазия), т.е. тесен обхват на лечебно въздействие на това средство;
- наличие само на килърна активност;
- високо ниво на опасност от възникване на странични ефекти, свързани с това, че известното БАС е високомолекулно съединение.

Както и в изброените по-горе случаи, свойствата на известното БАС, преди всичко неговата специфична активност, са пряко свързани с метода за неговото получаване, включващ смилане и хомогенизация на животинската суровина, нейното последващо центрофугиране и отделяне от хомогената с клетъчни мембрани на утайката, от която след ресуспендиране и солублизация се получават компоненти на клетъчните мембрани, които се използват като целеви продукт (ЕР-А-0318030).

В сравнение с гореизброените методи за получаване на БАС известният метод има предимството, че позволява да се получават по-високоспецифични вълеродсъдържащи компоненти от клетъчните мембрани, които са способни да предизвикват ответна реакция на

имунната система на организма срещу присъствието на туморноспецифичен антиген.

Освен това, преимущество на известния метод е по-високата ефективност на отделяне на въглеродсъдържащи компоненти.

Но на известния метод са присъщи изброените по-горе недостатъци, а именно:

- необходимост от използване на детергенти, които впоследствие трудно се отстраняват и чието наличие предизвиква отрицателни странични ефекти при клинично използване на това средство;

- сравнително ниска производителност и трудоемкост на известния метод;

- зависимост от наличието на специфични ракови тъкани като изходна суровина.

Известен е лекарствен препарат за нормализиране на физиологичното състояние на организма на човека и животните на основата на представените органични съединения на компонентите на клетъчните мембрани (EP-A-0318030). Препаратът се въвежда в организма в продължителен период от време чрез ежедневни венозни или мускулни инжекции в доза от 0,001 до 1000 g, която зависи от възрастта, пола и стадия на заболяване на пациента.

При венозно въвеждане, като пълнител се използва физиологичен разтвор на натриев хлорид или буферен разтвор.

Основно действащо начало на този препарат е БАС във вид на туморспецифичен антиген, предизвикващ имунна реакция на организма. За засилване на тази реакция и пролонгиране на ефекта отделеният антиген се вгражда в липозоми. При мускулни инжекции, като пълнители в препарата се използват различни адюванти, състоящи се предимно от масла, в които полученото БАС се суспензира.

Недостатък на известния лекарствен препарат е, че той осигурява високоспецифично стимулиране на имунната система на организма, което е насочено към унищожаване на определена патология (на конкретен вид неоплазия), и поради присъствието на високомолекулни съединения се съпровожда с появата на редица нежелателни странични явления, нарушаващи други параметри на хомеостаза. Например при мускулни инжекции или подкожно въвеждане възникват локално, а при венозни инжекции - общо, възпаление, а така също алергия, хиперчувствителност от забавен тип и други явления.

Известен е препарат за нормализиране на физиологичното състояние на организма на човека и животните, съдържащ биологично активно средство на основата на пълнител и на представените органични съединения от компонентите на клетъчни мембрани от животинска тъкан, който се налага върху повредени участъци от тялото (US-A-4455302).

Недостатък на известния лекарствен препарат е, че стимулирането на имунната система в организма е възможно само само чрез локална апликация върху травмираните участъци от тялото. Затова ефективността на този препарат е сравнително ниска.

Указаните недостатъци са частично остстранени в аналогичен препарат с имуномодулиращо действие за нормализиране на физиологичното състояние на организма на човека и животните (SU-A-904707), който се въвежда в организма чрез мускулни инжекции с доза 0,75 - 1,0 ml/Kg тегло на тялото през интервал от 3 дни и по този начин се използва нелокално.

Недостатък на този препарат е, че той е със сравнително невисока ефективност поради съдържащите се в него имунодепресанти, а така също и това, че неговото използване предизвиква странични ефекти поради наличието на имуногени в него, които предизвикват алергия, хиперчувствителност от забавен тип и др.

Използването на животинска тъкан като суровина, съдържаща сравнително голямо количество имунодепресанти, и невъзможността чрез изпълняваните по известния метод операции да се подобри съставът на БАС, който е в основата на лекарствения препарат, съществено намаляват ефективността на известното БАС и препаратата на негова основа.

Съществен недостатък на известния препарат е и това, че за осигуряване на достатъчна ефективност той съдържа в своя състав голямо количество различни биологични активни вещества, което определя, от една страна, опасност от предозиране и възникване на странични ефекти, а от друга - увеличава стойността на препарата.

Известен е метод за нормализиране на физиологичното състояние на човека и животните при заболявания, предизвикани предимно от функционална недостатъчност на органите и тъканите, при който в организма се въвежда препаратът на основата на органични съединения от компоненти на клетъчни мембрани от животинска тъкан (SU-A-904707).

Известният метод е слабо ефективен поради наличието на описаните по-горе недостатъци на препаратата, включително и поради това, че при неговото използване се изисква въвеждането на големи дози, съдържащи до 10 mg биологично активно средство на 1 Kg тегло от тялото. Това предизвиква опасност от предозирание и възникване на странични ефекти.

СУЩНОСТ НА ИЗОБРЕТЕНИЕТО

Указаните недостатъци са отстранени в заявеното биологично активно средство с имуномодулиращо свойство, в заявения метод за получаване на това средство и препаратата на негова основа, а така също - в метода за използването му за нормализиране на физиологичното състояние на организма.

Анализът на известните БАС и на методите за тяхното получаване, съвкупността от признаците, на които определя техническото ниво в дадената област, позволява да се формулира задачата за създаване на биологично активно средство с широк спектър на имуномодулиращо действие, с висока степен на ефективност, лишено при това от недостатъците, свързани с наличието на странични ефекти, възникващи при използването на известните БАС и изразяващи се например в алергии и др.

Съгласно изобретението БАС с имуномодулиращо свойство и предназначено за нормализиране на физиологичното състояние на организма, включително за възстановяване на функционалната активност на органи и тъкани, на основата на представените органични съединения от компонентите на клетъчни мембрани на хомогенизирана животинска тъкан, съдържа термостабилни, нискомолекулни модифицирани компоненти на клетъчни мембрани с антигенна структура, модифициране при процеси на ембриогенеза и/или пролиферация, и/или на диференцирането на клетките, и/или на паталогията, предшестваща и/или съпътстваща регенерацията и/или репарацията на тъканите.

Заявеното БАС съдържа модифицирани компоненти на плазматични клетъчни мембрани с антигенна структура, която е модифицирана при процесите на ембриогенеза и/или пролиферация, и/или на диференцирането на

клетките, и/или на паталогията, предшестваща и/или съпътстваща регенерацията и/или репарацията на тъканите.

При това заявеното БАС може да съдържа модифицирани компоненти на клетъчните мембрани във вид на термостабилни при температура $T_H \leq 120^\circ\text{C}$ компоненти, а така също във вид на нискомолекулни компоненти с молекулна маса $M=0,8 - 10,0\text{KDa}$ и във вид на въглеродсъдържащи компоненти.

Заявеното средство съдържа органични съединения в следното тегловно отношение в %:

Пептиди	28,0 - 60,0
Аминокиселини	0,5 - 31,5
Въглеводороди	16,0 - 70,0
Липиди, нуклеотиди и други органични съединения	0,5 - 17,0

Заявеното средство съдържа въглеводороди в състава на органичните съединения в следното процентно съотношение в състава:

- високомолекулни съединения с молекулно тегло $M_{yB} > 10,0\text{ KDa}$	- до 3,0
- нискомолекулни съединения с молекулно тегло $M_{yH} = 0,8 - 10,0\text{ KDa}$	11,5 - 57,9
- свободни мономерни с $M_{yM} < 0,8\text{ KDa}$	3,4 - 17,0

В заявеното БАС съотношението на съдържанията на въглеводородите и пептидите в състава на органичните съединения с молекулно тегло $M_{yH} = 0,8 - 10,0\text{ KDa}$ е в границите $G = 0,6 - 2,0$.

Заявеното средство може да съдържа също органични съединения в следното съотношение в %:

Пептиди	40,0 - 60,0
Аминокиселини	12,9 - 17,1
Въглеводороди	16,0 - 32,8
Липиди, нуклеотиди и други органични съединения	4,4 - 10,6

Освен това заявеното средство може да съдържа в състава си органични съединения в следното съотношение в %:

Пептиди	34,0 - 50,1
Аминокиселини	16,6 - 22,6
Въглеводороди	22,7 - 34,2
Липиди, нуклеотиди и други органични съединения	5,4 - 10,6

Освен това заявеното средство може да съдържа в състава си органични съединения в следното съотношение в %:

Пептиди	28,0 - 36,6
Аминокиселини	16,5 - 31,5
Въглеводороди	26,9 - 37,9
Липиди, нуклеотиди и други органични съединения	8,6 - 17,0

Освен това заявеното средство може да съдържа в състава си органични съединения в следното съотношение в %:

Пептиди	29,0 - 36,3
Аминокиселини	по-малко от 0,5
Въглеводороди	57,7 - 70,0
Липиди, нуклеотиди и други органични съединения	0,5 - 5,5

Поставената задача се решава и като в метода за получаване на БАС с имуномодулиращо свойство, при който се осъществява смилане на промитата суровина от животинска тъкан, а от хомогената се отделя съдържащата клетъчни мембрани утайка, от която след ресуспендиране се получават компоненти на клетъчните мембрани, като суровина се използва животинска тъкан, модифицирана при процесите на ембриогенезата и/или на пролиферацията, и/или на диференцирането на клетките, и/или на патологията, която предшества и/или съпътства регенерирането и/или репарирването на тъканта, чийто хомогенат пречистват от неразрушени тъканни елементи чрез филтриране и/или центрофугиране при ускорение 150 - 250 g в продължение на 10 - 15 min, като се отделя утайката, съдържаща клетъчни мембрани, която се хидролизира, и продуктите от т хидролизата се филтрират и/или центрофугират при ускорение над 1500 g в продължение на 20-40 min с отделяне на супернатанта от продуктите на хидролизата, съдържащи компоненти на клетъчни мембрани като целеви продукт.

Като суровина се използва тъкан, която се избира от: ембрионална тъкан, тъкан от диференциращи се тимоцити от тимуса, сперматогонии и сперматоцити от семенници, плацентна тъкан, епителна тъкан от червата, клетки от костен мозък, регенерираща се кожна тъкан, тъкан от регенериращ се черен дроб, тъкан от регенериращи се крайници на земноводни, патологично изменена тъкан, взета преди стадия на регенерация.

При това утайката, съдържаща клетъчни мембрани, се отделя от пречистения хомогенат чрез центрофугиране при ускорение 1500 - 90000 g и/или чрез филтриране през филтър с характерен размер $F < 1 \mu m$ със следващо промиване чрез ресуспендиране и повторно центрофугиране и/или филтриране до получаване на утайка, съдържаща клетъчни мембрани в количество, не по-малко от 60% тегловни от представените в утайката органични съединения.

Освен това утайката с клетъчните мембрани преди хидролизата допълнително се центрофугира при ускорение 20000 - 100000 g в градиента на плътност в продължение на 1 - 2 h с отделяне на плазматичните клетъчни мембрани.

Хидролизата протича при температура $T_p = 4 - 45^{\circ} C$. При това хидролизата може да се осъществява при наличието на консервант.

Поставената задача се решава още, като продуктите от хидролизата, съдържащи компоненти на клетъчни мембрани, се подлагат на термообработка при температура $T_n = 60 - 120^{\circ} C$ до пълното денатуриране на термонестабилните съединения и допълнително се филтрират и/или центрофугират при ускорение над 1500 g в продължение на 20 - 40 min с отделяне на супернатанта, съдържаща термостабилни компоненти на клетъчни мембрани като целеви продукт.

Освен това съдържащата компоненти от клетъчни мембрани супернатанта или продуктите от хидролизата се фракционират чрез диализа през полупроницаема мембрана и/или ултрафилтрация, и/или гелфилтрация с отделяне на фракция, съдържаща нискомолекулни компоненти на морфоплазмата и гликокаликса на клетките с молекулна маса $M \leq 10,0 \text{ KDa}$ като целеви продукт.

Поставената в изобретението задача се решава и като известният препарат за нормализиране на физическото състояние на организма на човека и животните, съдържащ биологично активно средство на базата на продуктите от хидролизата на инградиенти от животинска тъкан и пълнител, като биологично активно средство съдържа в състава си продукти от хидролизата на термостабилни, нискомолекулни компоненти на морфоплазмата и гликокаликса на клетките, модифицирани в процеса на ембриогенезиса и/или на пролиферицията, и/или диференцирането на клетките, и/или на патологията, която предшества и/или съпровожда регенерацията и/или репарацията на тъканите, като неговото съдържание в препарата е 0,001 - 85,0 мас.%, а останалото е пълнител.

Задачата се решава и като в препарата биологично активното средство съдържа в състава си модифицирани компоненти на клетъчни мембрани като органични съединения в следното тегловно съотношение в %:

Пептиди	28,0 – 60,0
Аминокиселини	0,5 – 31,5
Въглеводороди	16,0 – 70,0
Липиди, нуклеотиди и други органични съединения	0,5 – 17,0

Освен това задачата може да се реши и като БАС съдържа органичните съединения в тегловно отношение, %:

Пептиди	40,0 – 60,0
Аминокиселини	12,9 – 17,1
Въглеводороди	16,0 – 32,8
Липиди, нуклеотиди и други органични съединения	4,4 – 10,6

Задачата може да се реши и като БАС съдържа органичните съединения в тегловно отношение, %:

Пептиди	34,0 – 50,1
Аминокиселини	16,6 – 22,6
Въглеводороди	22,7 – 34,2
Липиди, нуклеотиди и други органични съединения	5,4 – 10,6

Задачата може да се реши и като БАС съдържа органичните съединения в тегловно отношение, %:

Пептиди	28,0 – 33,6
Аминокиселини	16,5 – 31,5
Въглеводороди	26,9 – 37,9
Липиди, нуклеотиди и други органични съединения	8,7 – 17,0

Задачата може да се реши и като БАС съдържа органичните съединения в тегловно отношение, %:

Пептиди	29,0 – 36,3
Аминокиселини	по-малко от 0,5
Въглеводороди	57,7 – 70,0
Липиди, нуклеотиди и други органични съединения	0,5 – 5,5

Препаратът, който се използва като пълнител, може да съдържа физиологичен разтвор на натриев хлорид и/или солен буферен разтвор, и/или въглеводородни съединения, и/или мазнини от

минерален, животински, растителен или синтетичен произход, както и техни смеси.

Препаратът може допълнително да съдържа консервант.

Поставената задача се решава и като в известния метод за нормализиране на физиологичното състояние на човека и животните при заболявания, предизвикани предимно от функционална недостатъчност на органите и тъканите, изискващ въвеждане в организма на препарата на основата на органични съединения от компоненти на клетъчни мембрани от животинска тъкан, като препарат се използва композиция от 0,001-85 тегл.% биологически активно средство, съдържащо в състава си модифицирани компоненти на клетъчните мембрани с антигенна структура, модифицирани при процесите на ембриогенеза и/или пролиферация, и/или диференциране на клетките, и/или патология, предшестваща или съпътстваща регенерацията и/или вепарацията на тъканите, и 15,0 до 99,999 тегл.% пълнител, а въвеждането на препарата в организма става с вътрешномускулни инжекции с доза 0,005 - 0,5 mg от упоменатото средство на Kg от тялото с интервал между инжекциите 1 - 7 дни и/или чрез инхалации в доза 0,012 - 0,12 mg от средството на Kg от тялото с интервал между инхалациите 4 - 48 h, и/или чрез сублингвално въвеждане в доза 0,012 - 0,12 mg от средството на Kg от тялото с интервал между въвежданията 4 - 48 h, и/или чрез изпиване в доза 0,01 - 1,0 mg от средството на Kg от тяло с интервал между приеманията 1 - 10 дни, и/или интеранално въвеждане в капсули в доза 0,02 - 1,0 mg от средството на Kg от тялото с интервал между въвежданията 1 - 10 дни, и/или интраназално въвеждане с денонощна доза 0,001 - 0,05 mg от средството на Kg от тялото с интервал между въвежданията 2 - 24 h, и/или апликация на слизеста или ранена повърхност чрез компреси, свещички, пудри, кремове и гелове с интервали между използването 1 - 10 дни, до нормализирането на параметрите на физиологичното състояние.

При това нормализирането на физиологичното състояние на човека и животните се осъществява чрез стимулиране на имунната система, предимно чрез активиране на решикулоендотелиалната система, Т-, В-системата, неутрофилите и/или популацията на естествените килъри.

Установено е, че практическата ефективност на заявеното БАС, получено по заявения метод, се състои в неговата висока

биологична активност и преди всичко - в повишения имуномодулиращ ефект (свойство).

Съпоставителният анализ на свойствата на известните и заявени БАС показва, че докато посочените по-горе известни БАС имат тяснонасочено имуномодулиращо действие с недостатъчна общобиологична активност, предизвикват отрицателни странични ефекти и изискват точно определяне на дозите за използване, заявеното БАС има широк спектър на действие и е високоефективно, некритично към предозиране и няма странични ефекти.

Експериментално е установено, че практическата ефективност на заявеното БАС, получено по заявения метод, се състои в неговата висока биологична активност и преди всичко в повишаване на имуномодулиращия и регенераторен ефект (свойство), което осигурява при въвеждането в организма на:

а) повишено стимулиране на регенераторните процеси, като: възстановяване на функционалната активност на тъканта на черния дроб при хепатит и регенериране на черния дроб след хепатектомия, заздравяване на язви, рани и кожна покривка при ранявания и травми, възстановяване на кръвната формула при загуби на кръв и в други случаи;

б) поява на лечебен ефект при лекуване на остри респираторни заболявания (ОРЗ), а така също при възпалителни процеси (възпаление на белите дробове, мастити, ендометрити и др.);

в) лечение на инфекциозни заболявания при животните (парагрип и др.), при което излекуването на млади животни едър рогат добитък е в средно не по-малко от 70% от случаите при спонтанно излекуване в контролната група в границите от 58 до 67% от случаите;

г) повишена резистентност на животните към инфекциозни заболявания и в резултат - намаляване на нивото на падеж на добитъка;

д) подобряване на общобиологичното състояние на животните, което се отразява благоприятно на тяхната продуктивност.

Практическото използване на заявеното БАС потвърждава неговата нетоксичност и липсата на странични явления (алергия, хиперчувствителност от забавен тип и др.).

Тези резултати са постигнати благодарение на особените свойства на заявеното БАС, чиято проява се осигурява от наличието в неговия състав на модифицирани компоненти, отделени от клетъчни

мембрани с модифицирана антигенна структура. Необходимо е да се отбележи, че изменението на физиологичния статус на тъканните клетки намира своето отражение в модифицирането на антигенните структури на клетъчните мембрани, което се съпровожда с модифициране на компонентите на клетъчните мембрани и изменение на имуногенността на тъканта, а следователно - и на реакцията на имунната система в организма.

Степента на такава модификация на антигенната структура на клетъчните мембрани и съответно степента на реакция на имунната система зависи от степента на изменение на физиологичния статус на клетките в тъканта.

Установено е, че повишаването на имуногенността на модифицираната антигенна структура на клетъчните и, преди всичко, на плазматичните клетъчни мембрани се осигурява чрез използване на животински тъкани, взети по време на стадия, когато в тях протичат посочените по-горе процеси на ембриогенеза и/или на пролиферация, и/или на диференциране, и/или на патологични процеси, които предшестват и/или съпътстват регенерирането и/или репарацията на тъканта.

Такива тъкани са:

- диференциращи се тимоцити на тимуса;
- сперматогонии и сперматоцити на семеници, клетки от костния мозък, епителна тъкан от черва;
- ембрионална тъкан, плацентна тъкан;
- тъкан от възстановяващи се крайници на земноводни, възстановяващ се черен дроб след частична хепатектомия или след поразяване с отровни вещества, например CCl_4 , регенерираща се кожна тъкан, а така също тъкан с патология в нея, например при гангрена, химично или термично поражение.

Използването на описаните животински тъкани като суровина в заявения метод осигурява получаване на БАС с очакваните свойства.

Установено е също така, че характерна особеност на изброените по-горе разновидности от тъкани е изменението в тях на имуногенната структура на клетъчните мембрани, която се съпровожда с модифициране на компонентите на клетъчните мембранни тъкани, позволяващи те да бъдат отделени от интактните или спокойните клетки на тъканите на възрастните екземпляри. Тази особеност на модифицираните компоненти на клетъчните мембрани на клетките на посочените тъкани позволява те да се използват в заявеното БАС, при въвеждането на който в организма на животното

или на човека се осигурява възможност за стимулиране на насочена ответна реакция на организма срещу патологията. Ключова роля в този процес играе имунната система на организма.

Материални носители на информация в изброените по-горе процеси и/или отклонения от нормата в посочените тъкани са специфичните компоненти на клетъчните мембрани. Заявеното БАС съдържа модифицирани компоненти на клетъчните мембрани с модифицирана антигенна структура, което позволява чрез неговото използване да се стимулира посочената по-горе ответна реакция на организма.

Ответната реакция на организма съществено се засилва при въвеждане на заявеното БАС, което съдържа в състава си компоненти от клетъчни мембрани във вид на термостабилни компоненти (стабилни при температура на нагряване $T_n = 120^\circ \text{C}$) във вид на нискомолекулни компоненти с молекулно тегло $M = 0,8 - 10,0 \text{ kDa}$, а така също като въглеродсъдържащи компоненти на клетъчни мембрани, преимуществено като гликопептиди, гликолипиди, олиговъглероди, нуклеотиди и/или свободни моновъглероди.

При това, благодарение на високата статична и динамична концентрация на компонентите на клетъчните мембрани в заявеното БАС се намалява съдържанието на имуноинхибитори и баластни съединения, поради което при наличие на висока специфична активност БАС на практика е лишено от проява на странични ефекти.

Заявеното БАС се използва като действащо начало в препаратите, в които в зависимост от предназначението се използват различни пълнители.

При това е дефинирана неочевидна зависимост между ефективността на препаратите и съдържанието на БАС. Това позволява значително да се намали съдържанието в препаратите на действащото начало при запазване на необходимата ефективност на препаратите и по този начин да се предотврати възможността от предозиране и възникване на странични ефекти, а така също - да се понижи съществено стойността му.

Освен това е определено, че описаните по-горе нови свойства на препаратите позволяват той да се използва за нормализиране на физиологичното състояние на организма при въвеждането му в организма практически във всякакви дози, а именно от 0,001 до няколко грама на 1 Kg тегло от тялото.

Изброените свойства се илюстрират по-долу с примери за конкретно изпълнение на изобретението, по-точно в примери 9,11,17,24,27-33 и др.

В гореописания метод, поради съвкупните фактори за използване на новия препарат, конкретните му дозировки, кратността на въвеждане в организма, а така също начините за въвеждането му в организма на човека и животните се осигурява лечение на заболявания, предизвикани предимно от функционална недостатъчност на органите и тъканите, което е илюстрирано по-долу в примерите за конкретно използване на изобретението, по-точно в примери 13,16-18, 20,21,23,24,31,32 и др.

За вътрешно използване препаратът се предписва във вид на инжекции и като пълнител се използва физиологичен разтвор на натриев хлорид или буферен солеви разтвор. За външно използване, освен изброените разтвори, като пълнител могат да се използват и съставни компоненти за гелове - въглеродородни съединения както от животински, така и от растителен произход като мед, сокове, меки части от растения и др., или на кремове - мазнини от минерален, животински, растителен или синтетичен произход и техните смеси.

ОПИСАНИЕ НА ПРИЛОЖЕНАТА ФИГУРА

На фигурата схематично са показани кривите на температурно-времевата зависимост на ефективността на заявеното БАС при процеса на хидролизиране на утайката, съдържаща клетъчни мембрани.

ПРИМЕРНИ ВАРИАНТИ ЗА ИЗПЪЛНЕНИЕ НА ГРУПАТА ИЗОБРЕТЕНИЯ

В съответствие с изобретението биологично активното следствие с имуномодулиращо свойство за нормализиране на физиологичното състояние на организма се получава по следния начин.

Като суровина се взима животинска тъкан, модифицирана при ембриогенеза и/или при пролиферация, и/или при диференциране, и/или при патология, предшестваща и/или съпровождаща регенерация и/или репарация на тъканта. Тази животинска тъкан се измива и се смива, след което се хомогенизира във физиологичен и/или буферен разтвор до пълното разрушаване на клетките, а хомогенизираната смес се пречиства от неразрушените тъканни елементи чрез филтрация и/или центрофугиране при ускорение 150 - 250 g в продължение на 10 - 15 min. От пречистения хомогенат чрез

центрофугиране при ускорение 1500 - 90000 g и/или филтриране през филтър с характерен размер $F < 1 \text{ m}$ се отделя хидролизат, който съдържа клетъчни мембрани и се подлага на хидролиза. Продуктите от хидролизата се филтрират и/или центрофугират при ускорение над 1500 g в продължение на 20 - 40 min, като се отделя супернатантата от продукта от хидролизата, съдържащ компоненти на клетъчни мембрани като целеви продукт за нормализиране на физиологичното състояние на организма, по-специално за външно използване (инхалации, апликации, интранзално, като кремове и др.).

Ефективността на целевия продукт зависи от съдържанието на модифицирани компоненти на клетъчни мембрани. Увеличаването на тяхното съдържание се получава чрез избор на суровина с повишена интензивност на процесите на модификация в тъканите и чрез избор на оптимални условия за осъществяване на метода за нейната обработка.

Изборът на суровината от животинска тъкан се определя от интензивността в нея на процесите на модификация на антигенната структура на клетъчните мембрани, която се съпровожда с модифициране на компонентите на клетъчните мембрани при изменение на имуногенността на тъканите.

Установено е, че повишаването на имуногенността на модифицираната антигенна структура на клетъчните мембрани и преди всичко на плазматичните мембрани на клетките в животинските тъкани се осигурява по време на стадите, в които протичат упоменатите по-горе процеси на ембриогенеза и/или пролиферация и/или диференциране на клетките, и/или патологични процеси, които предшестват и/или съпътстват регенерирането и/или репарирването на тъканта.

Като животинска тъкан се използват по-специално:

- диференциращи се тимоцити на тимуса (процес на диференциране на клетките);
- сперматогонии и сперматоцити на семените, клетки от костния мозък, епителна тъкан от червата (процеси на пролиферация и диференциране на клетките);
- ембрионална тъкан, плацентна тъкан (процеси на пролиферация, диференциране, ембриогенеза);
- тъкан от възстановяващите се крайници на земноводни, възстановяващ се черен дроб след частична хепатектомия или след поразяване с отровни вещества, например CCl_4 , регенерираща се кожна тъкан, а така също тъкан с патология в нея, например при

гангрена, химично или термично поражение (комбинация в различно съчетание на гореизброените процеси) .

Използването на описаните животински тъкани като суровина в заявения метод осигурява получаване на биологично активно средство с очакваните свойства.

Установено е, че характерна особеност на изброените по-горе разновидности от тъкани е изменението в тях на антигентната структура на клетъчните мембрани, съпровождащо се с модифициране на клетъчните мембрани на тъканта, позволяващи те да бъдат отделени от интактните или спокойните клетки на тъканите на възрастните екземпляри. Тази особеност на посочените тъкани позволява те да се използват в заявеното БАС, при въвеждането на което в организма на животното или на човека се осигурява възможност за стимулиране на насочена ответна реакция на организма срещу собствената патология. Ключова роля в този процес играе имунната система на организма.

За предпочитане е да се използва животинска тъкан, взета в стадий на инкрементиране на процеса на модификация. Този стадий се определя емпирично по характера на изменението на имуногенността. Така при използване на ембрионална тъкан този период е равен на първата половина от ембриогенезата. Регенериращият се черен дроб на плъхове се използва през 4 - 12 h след частична хепатотомия, а когато се използват регенериращи се крайници на земноводни - на стадия на образуване на бластема.

За получаване на заявеното средство всяка от указаните тъкани след предварително смилане до състояние на кайма се хомогенизира в троен обем на буферен физиологичен разтвор в хомогенизатор до пълното разрушаване на клетките и получаване на еднородна маса. Хомогенатът се пречиства от неразрушени тъканни елементи чрез филтриране или центрофугиране с диапазон на ускоренията 150 - 250 g в продължение на 10 - 15 min, а от очистения хомогенат се отделя утайка, съдържаща клетъчни мембрани, които се подлагат на хидролиза.

Пречистването от неразрушени елементи тъкан се осигурява при центрофугирането в диапазон на ускоренията от 150 до 250 g в продължение на 10 - 15 min, което се обяснява с това, че при по-високи ускорения и удължено времетраене на процеса настъпва отлагане на клетъчните мембрани, а при ускорения под 150 g пречистването е нискоефективно.

Пречистването от неразрушени тъканни елементи се осигурява също и чрез филтриране в едропорест филтър, например чрез няколко слоя марля, чрез памучна тъкан или чрез капронови мрежи.

Утайката, която съдържа клетъчни мембрани, се отделя от пречистения хомогенат чрез центрофугиране при ускорения 1500 - 90000 g в продължение на 20 - 60 min или чрез филтриране.

Изборът на диапазона на ускоренията се определя от условията за отделяне на необходимите фракции на клетъчните мембрани, при които се отделя максимално количество плазматични клетъчни мембрани.

При ускорения под 1500 g отделянето на мембраните е неефективно, а над 90000 g се отлагат и други, баластни клетъчни образувания, които влошават качеството на БАС.

При това, от една страна, се постига отстраняване на голяма част от имунодепресантите в състава на кръвната плазма и екстракта от тъкани, а, от друга - се увеличава относителното съдържание на компонентите на морфоплазмата и гликокаликса на клетките, което е важно за тъканите, в които тяхното съдържание е ниско.

За повишаване на ефективността на целевия продукт утайката от клетъчни мембрани се пречиства от сорбираните и затворените вътре везикули и органели от компоненти на екстракта от тъкани. Затова утайката се промива чрез многократно суспендиране в прясна порция буферен разтвор или дестилирана вода със следващо повторно центрофугиране и/или филтриране до получаване на утайка, която съдържа клетъчни мембрани в количество, което не е по-малко от 60% от теглото на участващите органични съединения.

Относителното съдържание на клетъчни мембрани в утайката, отделена за хидролизацията, се определя по съдържанието на белтъци и въглеводороди в утайката и супернатанта, които са получени в процеса на ресуспендиране и центрофугиране при ускорения 100000 - 150000 g в продължение на 40 - 60 min.

Ефективността на целевия продукт в значителна степен нараства при повишаването в него на компонентите на плазматични клетъчни мембрани. За тази цел утайката с клетъчните мембрани преди хидролизата допълнително се ресуспендира и центрофугира при ускорения 20000 - 100000 g в продължение на 1-2 h в градиент на плътност, например на захарозата, фикола, перкола и др. съединения, с отделяне на плазматични клетъчни мембрани.

При използването на захарозата фракцията на плазматичните мембрани на клетките се отделя в диапазона на плътност $d=1,14-1,18$ съгласно известните методи (H.M.Berman, M.A.Spirtes, - *Biochemistry et biophysical acta*, - 1969, v.183,1, p. 10-18; J.Gurd, W.Evans, H.Perkins.-*Biochemistry Journal*,1973, v.135,4, p.827-823; G.Schapira, J.Dobocz, - *Biochemistry et biophysical acta*, - 1974, v.345,1, p. 348-358).

Получената фракция плазматични мембрани се промива от захарозата и сорбираните компоненти от екстракта чрез центрофугиране с физиологичен разтвор при ускорение 20000 - 100000 g в продължение на 20 - 40 min и получават утайка, съдържаща плазматични клетъчни мембрани.

Получените утайки, съдържащи клетъчни и/или плазматични клетъчни мембрани след ресуспендиране във физиологичен разтвор и/или буферен разтвор се хидролизират. Продуктите от хидролизата се филтрират и/или центрофугират при ускорение над 1500 g като при това се отделя супернатантата от продуктите на хидролизата, съдържащи компоненти на клетъчните мембрани като целеви продукт.

Ефективността на целевия продукт в значителна степен нараства при използване на компоненти на клетъчните мембрани във вид на нискомолекулни компоненти. Това позволява, от една страна, да се избегнат проявите на нежелани странични явления, а, от друга - да се получи препарат с широк профил на действие без ограничения върху спецификата на видовете животни, отговарящ на изискванията на медицината. За тази цел клетъчните мембрани се хидролизират, което разкъсва високомолекулните структурни образувания на клетъчните мембрани до получаването на продукти, съдържащи компоненти с по-малко молекулно тегло. Ефективността на продуктите на хидролизата зависи от спецификата на хидролизата, която в голяма степен зависи от температурно-времевите характеристики.

Установено е, че имуномодулиращото свойство на заявеното средство, по-специално повишаването на активността на макрофагите на перитоналния ексудат на плъхове, *in vitro* е максимално при хидролизиране в диапазона на работните температури $T_p = 4 - 45^{\circ}\text{C}$.

Отклоненията от този режим са нежелателни, тъй като:

- при $T_p < 4^{\circ}\text{C}$ силно нараства продължителността на хидролизата, което понижава икономическата ефективност;
- при $T_p > 45^{\circ}\text{C}$ настъпва спадане на активността на ферментите, осигуряващи хидролизата на суровината, и се ускоряват

процесите на разпадане на активните компоненти. Това понижава качеството на целевия продукт.

Продължителността на хидролизата се определя по достигането на максимално равнище на имуностимулиращия ефект (свойства) на заявеното средство, по-специално по активирането на макрофагите на перитоналния ексудат според НСТ-теста.

Продължителната хидролиза се извършва при наличието на консервант.

Повишаването на относителното съдържание (относителната концентрация) на нискомолекулните компоненти в продуктите на хидролизата по отношение към съдържанието на високомолекулни термонестабилни съединения се осигурява чрез термообработка на хидролизата до пълно денатуриране на термонестабилните съединения, които след това се отделят като утайка при центрофугирането с ускорение не по-малко от 1500 g в продължение на 20 - 40 min и/или при филтрацията. Супернатантът, който съдържа термостабилните компоненти, се използва като краен продукт.

Термообработката на продуктите от хидролизата се извършва в температурния диапазон $T_H = 60 - 120^\circ \text{C}$, тъй като излизането от този диапазон води до намаляване на специфичната активност на БАС.

Така при температура $T_H < 60^\circ \text{C}$ не всички белтъци се денатурират и в целевия продукт съдържанието на термонестабилни съединения е повишено. За сметка на това специфичната активност на средството е понижена. При температура $T_H > 120^\circ \text{C}$ настъпва скокообразно увеличаване на скоростта на структурните изменения в пептидните и въглеводородните компоненти на крайния продукт, което също понижава неговото качество.

След термообработката отделянето на термостабилните компоненти се осъществява чрез центрофугиране при ускорение, не по-малко от 1500 g в продължение на 20 - 40 min, тъй като при намаляване на тази стойност значително се понижава степента на отстраняване на денатурираните термонестабилни съединения, а времетраенето от 20 - 40 min е оптимално.

Коагулираните денатурирани термонестабилни съединения може да се отделят от супернатанта чрез филтриране през хартиен филтър.

Целевият продукт, който съдържа термостабилни компоненти на клетъчните мембрани, притежава по-голяма специфична активност в

сравнение със супернатанта на продуктите от хидролизата и позволява да се решава по-широк кръг от задачи. Той може да се използва и като средство за инжекции както във ветеринарията, така и в медицината.

По-нататък повишаването на специфичната активност на БАС се постига чрез отделяне на нискомолекулните компоненти с молекулно тегло $M < 10,0$ kDa от продуктите на хидролизата чрез диализа през полупропусклива мембрана и/или ултрафилтрация, и/или гелфилтрация. Това позволява напълно да се отделят високомолекулните съединения, които могат да предизвикват странични ефекти.

Както бе отбелязано по-горе, ефективността на заявеното БАС в голяма степен се определя от съдържанието на въглеродсъдържащи компоненти на клетъчните мембрани с молекулно тегло $M = 0,8 - 10,0$ kDa. Във връзка с това за получаване на целеви продукт с най-висока специфична активност от нискомолекулната фракция чрез афинна хроматография на лектините се отделят въглеродсъдържащите компоненти като гликопептиди, гликолипиди, олиговъглеродороди, нуклеотиди, а така също свободни моновъглероди, които се използват като краен продукт.

Така се постига повишаване на значението на ефективността на целевия продукт и липса на странични ефекти, което позволява полученият целеви продукт широко да се използва в медицината.

Заявеното БАС като действащо начало се използва за приготвяне на лекарствен препарат, където неговата концентрация зависи от целта на използване. В препаратите за кърмене и подхранване на животните концентрацията на БАС е ниска и нараства в препаратите за използване като инжекции, а така също - в кремове, гелове и прахове.

В зависимост от предназначението в препаратите се използват различни пълнители. В препаратите за инжекции, инхалации, апликации и интранзално използване се използва физиологичен разтвор на натриев хлорид или солев буферен разтвор. Въглеродородните съединения като пълнител се използват в препарати, предназначени за подхранване на пчели (например 10% захарен сироп) или за приготвяне на гелове (например мед, сокове, меката част на растения). За кремове като пълнител се използват мазнини от минерален, животински, растителен или синтетичен произход и смесите им.

По долу са дадени примери за конкретното изпълнение и използване на заявената група изобретения, а така също са изложени използваните методи за определяне на състава на биологично активните средства и свойствата им.

Пример 1

За получаване на заявеното БАС се използва ембрионална тъкан, взета в стадия на първата половина на бременността на крави. От ембрионите след дезинфекция в слаб разтвор на калиев перманганат (KMnO_4) се изрязват мускулната и кожната тъкан, черният дроб, далакът, подстомашната жлеза, бъбреците, белите дробове и сърцето, които се смилат и хомогенизират. След това 10 Kg от каймата се смесва с 30 Kg сантимоларен фосфатен солеви буферен разтвор (0,01 M PBS) pH 7,2, съдържащ сантимоларен двувалентен натриев фосфат и петнадесетсантимоларен разтвор на натриев хлорид (0,01 M Na_2HPO_4 и 0,15 M NaCl), и сместа се хомогенизира в колоидна мелница до получаването на еднородна маса. Неразрушените елементи на тъканта се отделят като утайка след центрофугиране с ускорение 150 g в продължение на 15 min. След отделянето на флотиратната мазнина чрез филтриране през памучна тъкан (американ) супернатантата се центрофугира при ускорение 1500 g в продължение на 60 min. Получената утайка, която съдържа клетъчни мембрани в количество 60% от наличните в нея органични съединения, се ресуспендира в 15 Kg сантимоларен фосфатен буфер (0,01 M PBS) и се центрофугира при ускорение 5000 g в продължение на 40 min. Утайката отново се ресуспендира в 7,5 Kg дестилирана вода и се центрофугира при ускорение 20000 g в продължение на 30 min, след което операцията по ресуспендиране във вода се повтаря още един път и се центрофугира още 40 min. Утайката се ресуспендира за четвърти път в 7,5 Kg сантимоларен фосфатен буфер (0,01 M PBS) и се центрофугира при ускорение 20000 g в продължение на 20 min.

Промитата по този начин утайка, която съдържа 90% клетъчни мембрани, след суспендиране в 5,0 Kg сантимоларен фосфатен буферен разтвор (0,01 M PBS) и добавяне на консервант (хинозол) до крайна концентрация 0,08 тегловни % се хидролизира при температура 4°C в продължение на 6 седмици.

Полученият хидролизат се центрофугира при ускорение 5000 g в продължение на 40 min за отделяне на супернатанта от продукти на хидролизата, съдържащи компоненти на клетъчните мембрани като целеви продукт, съставът на чиито органични съединения и

предизвикваната от тях специфична активност като количествени показатели на ефектите от БАС са представени в таблица 1 и 2.

Крайният продукт, съдържащ БАС в количество 1,0 тегловни %, а останалото – пълнител, се използва интраанално като лекарствен препарат за лечение на мастит при жените. Във всяка ноздра се закапват по 2 капки от препарата със следващ масаж за разтичане по слизистата повърхност. Процедурата се повтаря 2-3 пъти дневно. Лечебният ефект се проявява след 1 – 3 дни и се контролира по състоянието на гърдата (по наличието на уплътнения, гнойни секрети) и по анализа на кръвта.

Пример 2

Ембрионната тъкан, получена по същия начин както в пример 1, се смива и хомогенизира в троен обем физиологичен разтвор от натриев хлорид с помощта на хомогенизатор с ножови блендери до получаването на еднородна маса от разрушени клетки. За отстраняването на неразрушените елементи тъкан, включително и на елементите от съединителна тъкан, хомогенизираната маса се центрофугира с ускорение 250 g в продължение на 10 min. След центрофугирането утайката се отстранява, а получената супернатанта се филтрира през памучна тъкан и повторно се центрофугира с ускорение 90000g в продължение на 20 min. Отделената след центрофугирането утайка се ресуспендира в половината от първоначалния обем физиологичен разтвор и се центрофугира при същите условия. След това утайката се ресуспендира два пъти в дестилирана вода и един път – във физиологичен разтвор със следващо центрофугиране с ускорение 90000g в продължение на 20 min. Получената утайка, съдържаща клетъчни мембрани, се ресуспендира в 4 обема физиологичен разтвор и след добавяне на консервант до крайна концентрация 0,08 тегловни % се хидролизира при температура $T=20^{\circ}\text{C}$ в продължение на 8 дни.

Полученият хидролизат се центрофугира при ускорение 15000 g в продължение на 20 min за отделяне на супернатанта от продукти на хидролизата, съдържащи компоненти на клетъчните мембрани като целеви продукт, съставът на чиито органични съединения и предизвикваната от тях специфична активност като количествени показатели на ефектите от БАС са представени в таблица 1 и 2.

Таблица 1

Имуномодулиращи и регенераторни ефекти на биологично активните средства (БАС)		Количествени показатели на ефекта на БАС за примерите												
		№ 1	№ 2	№ 3	№ 5	№ 9	№ 11	№ 13	№ 16	№ 17	№ 18	№ 20	№ 21	
1. Повишаване на активността на макрофагите на перитонеалния ексудат на плъхове в % спрямо контролната група	На ферментативната активност (НСТ – test)	69,7	79,1	61,3	101,9	109,6	86,8	117,8	173,1	144,1	201,5	200,1	224,7	
	На фагоцитирателната активност по E. Coli	60,2	73,5	49,3	90,4	98,7	77,7	106,5	154,2	121,8	185,4	171,7	200,9	
2. Повишаване на активността на неутрофилите на кръвта в % спрямо контролната група	На ферментативната активност (НСТ – test)	82,7	93,7	74,9	115,9	124,5	102,1	131,3	149,1	129,0	168,4	161,0	181,6	
	На фагоцитирателната активност по E. Coli	60,5	70,1	52,1	78,4	81,3	67,5	85,9	104,2	85,8	120,6	113,6	129,2	
3. Стимулиране на реакцията на blast трансформацията в % спрямо контролната група	На Т-лимфоцитите	57,1	64,8	52,4	83,5	87,4	65,8	10,6	132,5	111,4	152,0	160,3	191,9	
	На В-лимфоцитите	75,4	85,9	69,3	118,8	126,1	100,4	137,2	193,6	163,9	220,9	224,7	262,5	
4. Увеличаване на титра на тимичния серумен фактор (ТСФ) в % спрямо контролната група		302,6	387,4	234,5	497,2	432,7	426,3	566,5	766,2	649,7	858,9	889,8	1007,6	
5. Стимулиране на естествената килърна активност на спленоцитите на плъхове в % спрямо контролната група		69,3	81,3	61,9	99,2	106,4	89,2	113,6	145,2	117,2	170,0	182,0	212,2	
6. Засилване на сепарационните способности на хепатоцитите на плъхове за възстановяване на активността след въвеждане на CCl_4 в % спрямо контролната група	Na, K – АТФаза	34,2	40,5	30,3	57,4	60,8	49,2	63,4	87,1	78,4	94,0	91,4	100,0	
	Аминотрансфераза на кръвта	70,7	81,9	61,3	92,4	93,5	86,8	96,0	97,1	93,0	100,0	96,2	100,0	
	Концентрация на K^+ хепатоцити	24,6	30,1	20,7	42,6	44,1	35,8	46,6	67,2	58,0	75,4	75,1	93,5	

Таблица 2

ОРГАНИЧНИ СЪЕДИНЕНИЯ	СЪДЪРЖАНИЕ НА ОРГАНИЧНИ СЪЕДИНЕНИЯ В БАС ОТ ПРИМЕРИТЕ, мас. %												
	№ 1	№ 2	№ 3	№ 5	№ 9	№ 11	№ 13	№ 16	№ 17	№ 18	№ 20	№ 21	
ПОЛИПЕПТИДИ	37,7	34,7	40,9	20,6	21,9	25,1	13,7	< 0,3					
ПЕПТИДИ	18,0	18,5	19,1	20,1	23,9	25,0	20,3						
Σ	55,7	53,2	60,0	40,7	45,8	50,1	34,0						
АМИНОКИСЕЛИНИ	12,9	13,2	13,4	17,1	17,5	16,6	22,6	31,5	24,0	16,5	< 0,5		
ВЪГЛЕВОДОРОДИ В СЪСТАВА	< 0,2												
Високомолекулярни съединения с молекулна маса M > 10,0 KDa													
Нискомолекулярни съединения с молекулна маса M = 0,8 – 10,0 KDa													
Свободни мономери или съединения с молекулна маса M < 10,0 KDa	5,0	4,0	1,0	2,2	0,8	0,4	1,4	23,2	20,0	30,8	41,4	57,9	
	15,5	19,5	11,5	24,1	21,0	15,0	22,3	8,5	6,7	6,9	16,1	11,9	
	6,5	5,5	3,5	6,5	9,5	7,3	10,5	31,9	26,9	37,9	57,7	70,0	
ВСИЧКО	27,0	29,0	16,0	32,8	31,3	22,7	34,2	8,6	15,5	17,0	5,5	0,5	
ЛИПИДИ, НУКЛЕОТИДИ И ДРУГИ ОРГАНИЧНИ СЪЕДИНЕНИЯ	4,4	4,6	10,6	9,4	5,4	10,6	9,2	00,0	100,0	100,0	00,0	100,0	
ВСИЧКО	100,0	100,0	100,0	00,0	00,0	100,0	100,0	00,0	100,0	100,0	00,0	100,0	
СЪОТНОШЕНИЕ МЕЖДУ ВЪГЛЕВОДОРОДИТЕ И ПЕПТИДИТЕ G	0,86	1,05	0,60	1,20	0,88	0,60	1,10	0,84	0,60	1,20	1,15	2,00	
K	0,61	0,76	0,47	1,06	0,98	0,72	1,15	1,60	1,47	1,90	1,90	2,20	

G и K – коефициенти, които характеризират относителното съдържание на въглеродородите към пептидите в съединенията с молекулна маса $M = 0,8 - 10,0$ KDa

Целевият продукт, съдържащ БАС в количество 1,0 мас.%, а останалото – пълнител, се смесва с 5 обема физиологичен разтвор на натриев хлорид и се използва като лекарствен препарат – компреси за лечение на варикозно разширение на вените на краката. Всяка вечер се слагат нощни компреси. Лечебният ефект се проявява на 5-14 ден и се контролира по състоянието на кръвоносните съдове, оттоците на краката и усещането за болка.

Пример 3

Хомогенизацията на ембрионната тъкан се извършва по същия начин, както в пример 2. За отделяне на неразрушените елементи от тъкан хомогенизираната маса се филтрира през памучна тъкан (американ) в нутч-филтър под вакуум. След това 50 Kg от филтрата се подлагат на ултрафилтрация през кухи влакна ВПУ-100-ПА (ТУ 6-12-151-87) в апарата АР-2,0. В процеса на рециркулацията през кухите влакна от хомогената се отделя екстракт от тъкан, компонентите на който имат молекулно тегло $M < 100 \text{ KDa}$, а високомолекулните съединения се концентрират. Хомогенатът с тегло 50 Kg се концентрира до получаването на суспензия от клетъчни мембрани с тегло 5 Kg. Суспензията се смесва след това с 45 Kg физиологичен разтвор и отново се концентрира, като по този начин се пречиства фракцията на клетъчните мембрани от компонентите на ексудата с молекулно тегло $M < 100 \text{ KDa}$. Тази операция се повтаря 4 пъти. Получената суспензия съдържа 60 тегловни % клетъчни мембрани от наличните в нея органични съединения. След добавянето на 10 Kg физиологичен разтвор се извършва автолиза при температура 45°C в продължение на 48 часа.

Полученият хидролизат се филтрира през хартиен филтър, а филтратът с компонентите на клетъчните мембрани, се използва като целеви продукт. Съставът на органичните съединения в него и предизвикваната от него специфична активност като количествени показатели на ефекта от БАС са показани в таблица 1 и 2.

Крайнният продукт, съдържащ БАС в количество 1,0%, а останалото – пълнител, се смесва с 9 обема краставичено пюре и се използва като лекарствен препарат като гел маска за лице с козметични цели. За продължително съхраняване в гела се добавя консервант (нипагин и нипазол в тегловно съотношение 5:1) с крайна концентрация 0,1 тегловни %. Гелът се полага върху лицето през 2-3 часа. Процедурата се повтаря 1-2 пъти седмично.

Лечебният ефект се проявява след 2-6 сеанса се контролира по състоянието на кожата.

Пример 4

Хомогенатът от ембрионна тъкан, очистен от неразрушена тъкан както в пример 3, се филтрира чрез кухи влакна GF/S, които задържат частици, по-големи от $1\text{ }\mu\text{m}$. Всички следващи операции са като в пример 3 и се получава целеви продукт със същия състав и свойства.

Пример 5

Утайката, която съдържа клетъчни мембрани, получена както в пример 1 след четирикратно промиване, се суспендира в концентриран разтвор на захароза с крайна плътност на получената суспензия $d_1 > 1,25$, която се ултрацентрифугира с ускорение 100000 g в продължение на 60 min със стъпален градиент на плътността на захарозата $d_1 > 1,25$, $d_2 > 1,20$, $d_3 > 1,18$, $d_4 > 1,16$, $d_5 > 1,14$, $d_6 > 1,12$. Фракцията от плазматични мембрани се отделя в интервала на плътност на захарозата $d = 1,18 - 1,14$. След това мембраните се отмиват от захарозата чрез центрофугиране във физиологичен разтвор при ускорение 20000 g в продължение на 60 min . Утайката се ресуспендира в четирикратен обем на сантимоларен фосфатен солен буферен разтвор ($0,01\text{ M PBS}$) pH 7,2 и след добавяне на консервант до крайна концентрация $0,08\text{ тегловни \%}$ суспензията от плазматични клетъчни мембрани се хидролизира при температура 4°C в продължение на 6 седмици.

Полученият хидролизат се центрофугира при ускорение 1500 g в продължение на 40 min за отделяне на супернатантата от продукти на хидролизата, съдържащи компоненти на клетъчните мембрани като целеви продукт, съставът на чиито органични съединения и предизвикваната от тях специфична активност като количествени показатели на ефектите от БАС са представени в таблица 1 и 2.

Целевият продукт, съдържащ БАС в количество $1,0\%$, а останалото – пълнител, се използва като лекарствен препарат за инхалации при лечение на бронхопневмония. Всекидневно преди лягане, през инхалатор се правят $10 - 15$ резки вдишвания през устата и издишвания през носа. Лечебният ефект се проявява след $2 - 8$ дни и се контролира по състоянието на белите дробове и анализа на кръвта.

Пример 6

Суспензията от клетъчни мембрани в захароза с крайна плътност $d > 1,25$, получена както в пример 5, се центрофутира при ускорение 20000 g в продължение на 2 h в същия стъпален градиент на захарозата. Всички следващи операции са както в пример 5, като се получава целеви продукт със същите свойства и състав.

Пример 7

За определяне на съдържанието на компонентите на клетъчните мембрани в процентно отношение (по тегло) към компонентите на съединителна тъкан и екстракта в заявеното БАС, получено в примери 1-6, се провежда аминокиселинен анализ, а така също се определя количеството на белтъчини и въглехидороди в утайката и супернатантата, получени чрез ултрацентрифугиране на суспензията от клетъчни мембрани с ускорение 100000 - 150000 g в продължение на 60 min преди провеждането на хидролизата.

Отношението на количеството белтъчини в цялата утайка и в цялата супернатанта определя отношението на белтъчините на компоненти на клетъчни мембрани към белтъчините на екстракта.

Определянето на съдържанието на белтъчини в утайката и в супернатантата се извършва след ултрацентрифугирането на суспензията. След като се отдели супернатантата, към 0,1 ml утайка се добавя 4,9 ml физиологичен разтвор и след суспендиране се взима 0,1 ml за фотометрично определяне на количеството белтъчини чрез интензивността на оцветяването на разтвора по метода SDS-Лоури (U.K.LAEMLI. Nature, 1970, v.227, -5259, p.680-685).

За определянето на количеството белтъчини в супернатантата се взима 0,1 ml от нея. При белтъчен анализ на средството, получено в примери 1, 2 и 5, съдържанието на компонентите на клетъчни мембрани е $88 \pm 8\%$, а в пример 3 - $70 \pm 10\%$.

Съдържанието на компонентите от съединителна тъкан се определя чрез аминокиселинен анализ чрез наличие на оксиглизан и оксипролин. В заявеното БАС не съдържат тези аминокиселини.

Определянето на количеството на въглехидороди в изследваните образци става чрез антрононовата реакция след отделянето от хомогената на гликогеновите гранули (S.Seifter, S.Dayton, C.Novic. Arch. Biochemistry and Biophysical, 1950, - 25, -1, p.191-200). При това се отчита общото съдържание на въглехидородите след хидролизата и съдържанието на свободни въглехидороди като мономери. По разликата на тези измерени

величини се определя количеството свободни въглеродороди в състава на различните съединения.

За обща хидролиза се взима 1,0 ml от изследвания образец и се смесва с 1 ml четириноормален разтвор на солна киселина (4,0 N HCl). Хидролизата се извършва при температура 105°C в продължение на 2 h, след което хидролизатът се напарва в ексикатор със суха натриева основа (NaOH) във вакуум. Изсушената проба се разтваря в 1,0 ml дестилирана вода и се използва за анализ.

Определянето на количеството свободни въглеродороди непосредствено в БАС или след киселинната хидролиза се извършва така: 1 ml от пробата се смесва с 1 ml дестилирана вода, след което едновременно с непрекъснато разбъркване при температура -5°C се добавят 4 ml 0,2%-ов антронов реактив, приготвен от 95%-на сярна киселина (H_2SO_4). Получената смес се кипва при температура 95°C в продължение на 10 min и след охлаждането и се определя оптичната плътност за дължина на вълната 620 nm. За стандарт служи гликоза с концентрация 20 μ g/ml.

Съдържанието на концентрацията на въглеродороди в състава на структурните съединения с молекулно тегло $M > 0,8$ KDA в заявеното БАС в примери 1,2,3 и 5 е съответно 20,5%, 24,5%, 12,5% и 26,4% по отношение на останалите инградиенти.

Тук и по-нататък в текста значението на експериментално определените величини е дадено в средните им значения с гранични отклонения от средното, изчислени по критерия на Стюдънт.

Пример 8

Супернатантата на хидролизата, получена в пример 1, се подлага на термообработка при температури на нагряване (термообработка): $T_{H1} = 55^{\circ}C$, $T_{H2} = 60^{\circ}C$, $T_{H3} = 95^{\circ}C$, $T_{H4} = 120^{\circ}C$, $T_{H5} = 135^{\circ}C$. Нагряването се поддържа до пълната денатурация на термонестабилните съединения в състава на продуктите от хидролизата, след това се центрофугира при ускорение над 1500 g в продължение на 30 min и се отделя като целеви продукт супернатантата, съдържаща термостабилните компоненти на клетъчните мембрани. Във всички случаи полученият целеви продукт има свой имуномодулиращ ефект, значенията на който са дадени в таблица 3. В нея е дадена специфичната активност (активирането на макрофагите) в зависимост от избрания температурен диапазон за нагряване на хидролизата и извън границите на този диапазон.

Оптимална е температура за нагриване $T_H = 95^{\circ}\text{C}$, при която полученият целеви продукт осигурява максимално усилване на ферментативната и фагоцитна активност, което съответно е $102,3 \pm 5,5\%$ и $92,1 \pm 7,4\%$. При $T_H = 55^{\circ}\text{C}$ повишаването на величината на специфичната активност, сравнено с контролата, е средно $76,8 \pm 4,6\%$ по НСТ-теста и $53,8 \pm 5,1\%$ по фагоцитоза. При $T_H > 20^{\circ}\text{C}$ настъпва скокообразно увеличаване на скоростта на структурните изменения на пептидите и въглеродосъдържащите съединения, поради което настъпват структурни промени в компонентите на целевия продукт и се понижава специфичната активност на средството. Така при $T_H = 135^{\circ}\text{C}$ повишаването на специфичната активност на заявеното БАС в сравнение с контролата е средно $68,4 \pm 5,0\%$ – по НСТ-теста и $66,2 \pm 6,1\%$ – по фагоцитозата. Максималната величина на специфичната активност на БАС в сравнение с контролата е в температурния диапазон $T_H = 60 - 120^{\circ}\text{C}$, в който повишаването на активността на макрофагите на перитонеалния ексудат на плъхове (*in vitro*) е средно $102,8 \pm 5,5\%$ – за усилването на ферментативната активност (НСТ-тест), а за усилването на фагоцитарната активност (по E.Coil) – $92,1 \pm 7,4\%$.

Пример 9

Супернатантата на хидролизата от пример 1 се подлага на термообработка чрез кипване при температура на нагриването $T_H = 95^{\circ}\text{C}$ до пълното денатуриране на термонестабилните съединения и след охлаждане се центрофугира с ускорение $1500g$ в продължение на 40 min. Утайката от денатурирани съединения се отстранява, а като целеви продукт се използва супернатанта, която съдържа термостабилни компоненти от клетъчни мембрани. Съдържанието на органичните съединения в продуктите на хидролизата и количествените показатели на ефектите на БАС са дадени в таблици 1 и 2.

Краиният продукт, който съдържа БАС 1,0 тегловен %, а останалото е пълнител, се използва като лекарствен препарат за лечение на дерматози като мехлем, който се приготвя чрез смесване на ланолин, вазелин и целеви продукт в съотношение 1:3:1 части. Мехлемът се разтърква в кожата ежедневно. Лечебният ефект се проявява след 2 – 8 дни и се контролира по състоянието на кожата.

Таблица 3

Температура на нагряването (термообработката), °C	Активиране на макрофагите на перитонеалния ексудат на плъхове (in vitro) след въздействие на заявеното БАС, получено при различна термообработка, в % спрямо контролата	
	Усилване на ферментната активност (НСТ-тест)	Усилване на фагоцитната активност по E. Coli
55	76,8 ± 4,6	53,8 ± 5,1
60	82,5 ± 4,9	70,8 ± 6,5
95	102,3 ± 5,5	92,1 ± 7,4
120	88,4 ± 5,1	78,3 ± 7,0
135	68,4 ± 5,0	66,2 ± 6,1

Различията с контролата са достоверни при $P < 0,05$

Таблица 4

Пореден номер на фракцията	Молекулно тегло на фракцията M, KDa	Активиране на перитонеалния ексудат на плъхове след въздействие на нискомолекулните фракции на заявеното БАС в % спрямо контролата
1	$M_1 > 50,0$	58,4 ± 4,5
2	$10,0 < M_2 < 50,0$	103,6 ± 9,2
3	$M_3 < 10,0$	170,3 ± 18,1
4	$M_4 < 5,0$	186,8 ± 14,2
5	$M_5 < 1,0$	138,7 ± 12,3
6	$M_6 < 0,8$	86,2 ± 7,7
7	$M_7 < 0,5$	55,1 ± 6,4

Различията с контролата са достоверни при $P < 0,05$

Пример 10

Хидролизатът от пример 1 се подлага на термообработка чрез кипване при $T_H = 95^{\circ}\text{C}$ до пълното денатуриране на термонестабилните съединения и след охлаждане се центрофугира с ускорение 1500 g в продължение на 40 min. Утайката от денатурирани съединения се отстранява, а супернатантата, която съдържа термостабилни компоненти на клетъчни мембрани, се използва като целеви продукт със същите свойства и състав.

Пример 11

Супернатантата от хидролизата от пример 3 се подлага на термообработка при $T_H = 95^{\circ}\text{C}$ до пълното денатуриране на термонестабилните съединения и след охлаждане се филтрира през филтрова хартия в нутчфилтър. Като целеви продукт се използва филтратът с термостабилни компоненти на клетъчни мембрани.

Съдържанието на органичните съединения в продуктите на хидролизата и качествените показатели на ефектите на БАС са дадени в таблици 1 и 2.

Целевият продукт се изсушава лиофилно и се използва сублингвално като лекарствен препарат за лечение на женски мастит. Процедурата се повтаря всеки ден. Лечебният ефект се проявява след 1 - 3 дни и се контролира по състоянието на гърдата (по наличието на уплътнения, гнойни секрети) и по анализа на кръвта.

Пример 12

Хидролизатът от пример 3 се подлага на термообработка при температура $T_H = 95^{\circ}\text{C}$ до пълното денатуриране на термонестабилните съединения и след охлаждане се филтрира през филтрова хартия в нутчфилтър. Като целеви продукт със същите свойства и състав като в пример 11 се използва филтратът с термостабилни компоненти на клетъчни мембрани.

Пример 13

Супернатантата от пример 5 се подлага на термообработка чрез кипене при температура на нагряване $T_H = 95^{\circ}\text{C}$ до пълното денатуриране на термонестабилните съединения и след охлаждане се центрофугира с ускорение 50000 g в продължение на 20 min. Утайката от денатурирани съединения се отстранява, а

супернатантата, която съдържа термостабилни компоненти на плазматични клетъчни мембрани, се използва като целеви продукт.

Съдържанието на органичните съединения в продуктите на хидролизата и качествените показатели на ефектите на БАС са дадени в таблици 1 и 2.

Целевият продукт, съдържащ БАС в количество 0,5 тегловни %, а останалото – пълнител, се използва като лекарствен препарат за лечение на мастит при кравите като инжекции, които се бият мускулно с доза 0,05 ml/Kg през три дни. Лечебният ефект се проявява след 1 – 4 инжекции и се контролира по състоянието на вимето и по количеството на гнойни секрети от бозките.

Пример 14

Супернатантата от пример 5 се подлага на термообработка чрез кипене при температура на нагряване $T_H = 95^{\circ}\text{C}$ до пълното денатуриране на термонестабилните съединения и след охлаждане се центрофугира с ускорение 50000 g в продължение на 20 min. Утайката от денатурирани съединения се отстранява, а като целеви продукт се използва супернатанта, която съдържа термостабилни компоненти със същите свойства както в пример 13.

Пример 15

Супернатантата на хидролизата от пример 1 се фракционира чрез ултрафилтрационна установка "Amicon", като се използват ултрафилтри, които пропускат съединения с молекулно тегло, по-малко или равно на: 50,0KDa, 10,0KDa, 5,0KDa, 1,0KDa, 0,8KDa и 0,5KDa.

Биологичната активност на получените фракции, съдържащи съединения с молекулно тегло:

- 1) $M_1 > 50,0\text{KDa}$; 2) $10,0\text{KDa} < M_2 < 50,0\text{KDa}$;
- 3) $M_3 < 10,0\text{KDa}$; 4) $M_4 < 5,0\text{KDa}$; 5) $M_5 < 1,0\text{KDa}$;
- 6) $M_6 < 0,8\text{KDa}$; 7) $M_7 < 0,5\text{KDa}$,

е анализирана чрез способността да активират макрофагите на перитонеалния ексудат на плъхове по НСТ-теста. Резултатите от изследванията са дадени в таблица 4.

Анализът на данните от таблица 4 позволява да се направят следните изводи:

- 1) разпределението на специфичната активност по фракции има изразен максимум, който е в диапазона на молекулните тегла от 0,8 до 10,0 KDa;

2) понижаването на специфичната активност при молекулно тегло $M > 10,0$ KDa е свързано със засилването на влиянието на инхибиторите в целевия продукт и понижаването на концентрацията на активната субстанция;

3) понижаването на специфичната активност при молекуно тегло $M < 0,8$ KDa е свързано с намаляването на концентрацията на активна субстанция от олигомерни съединения с $M > 0,8$ KDa.

Пример 16

Супернатантата на хидролизата от примери 1 и 9 се ултрафилтрира чрез кухи влакна ВПУ-15-ПА (ТУ 6-12-151-87) с апаратура АР-2,0. Полученият ултрафилтрат, който съдържа нискомолекулните компоненти с молекулно тегло $M \leq 10,0$ KDa, се използва като целеви продукт, който съдържа нискомолекулни компоненти от клетъчни мембрани с $M \leq 10,0$ KDa.

Съдържанието на органичните съединения в продуктите на хидролизата и показателите на ефектите на БАС, които са определени експериментално, са дадени в таблици 1 и 2.

Крайният продукт, който съдържа БАС 0,1%, а останалото е пълнител, се използва като лекарствен препарат за лечение на експериментален хепатит в плъхове чрез инжекции, които се бият вътрешномускулно в доза 0,05 ml/Kg през ден (характерът и резултатите от лечението са изложени по-подробно в примери 42 и 43).

Пример 17

Хидролизатът от пример 3 се подлага на диализа в продължение на 16 - 24 h през целофанова ципа срещу физиологичен разтвор с 0,8 g консервант на всеки 1 Kg. Полученият диализат се използва като целеви продукт с нискомолекулни компоненти с $M \leq 10,0$ KDa.

Съдържанието на органичните съединения в продуктите на хидролизата и показателите на ефектите на БАС, които са определени експериментално, са дадени в таблици 1 и 2.

Полученият целеви продукт, който съдържа БАС 0,1%, а останалото е пълнител, се използва като лекарствен препарат за инжектиране на телета за нормализиране на периметрите на хомеостаза. Инжекциите на телета с отклонение от нормата се бият вътрешномускулно в доза 0,05 ml/Kg на всеки 1-2 месеца. Контролирането на ефекта се извършва чрез месечно претегляне на животните. Резултатите показват повишаване с 60 - 100% на

среднодневния прираст в сравнение с контролната група необработени с препарата животни.

Пример 18

Супернатантата на хидролизата от примери 5 и 13 се ултрафилтрира чрез кухи влакна ВПУ-15-ПА (ТУ 6-12-151-87) с апаратура АР-2,0. Полученият ултрафилтрат, който съдържа нискомолекулните компоненти с молекулно тегло $M \leq 10,0\text{KDa}$, се използва като целеви продукт, който съдържа нискомолекулни компоненти от клетъчни мембрани с $M \leq 10,0\text{KDa}$.

Съдържанието на органичните съединения в продуктите на хидролизата и показателите на ефектите на БАС, които са определени експериментално, са дадени в таблици 1 и 2.

Целевият продукт, който съдържа БАС 0,1%, а останалото е пълнител, се използва като лекарствен препарат за лечение на експериментална стомашна язва в плъхове чрез инжекции, които се бият вътрешномускулно в доза 0,05 ml/Kg и 0,5 ml/Kg (характерът и резултатите от лечението са изложени по-подробно в пример 44).

Пример 19

Супернатантата от хидролизата в пример 1 се подлага на гел-филтрация в сефадекс G-25 с колона с диаметър $d=26\text{ mm}$ и дължина $h = 600\text{ mm}$, уравновесен с децимоларен (0,01 M) фосфатен буферен разтвор pH 7,2, съдържащ петнадесет-сантимоларен натриев хлорид (0,15 M NaCl). Фракционирането на супернатантата на хидролизата по молекулни тегла става чрез елуиране на колоната със същия буферен разтвор, а хроматографският профил на елуата се контролира спектрометрично с дължина на вълната 280 nm. Фракцията от нискомолекулните компоненти хидролизат с компоненти на клетъчни мембрани се елуира като целеви продукт със същия състав и свойства като в пример 16.

Крайният продукт, който съдържа БАС 0,1%, а останалото е пълнител, се използва като лекарствен препарат за инжектиране на телета, които са болни от бронхопневмония или остри респираторни заболявания (ОРЗ), чрез вътрешномускулни инжекции с доза 0,05 ml/Kg на всеки три дни. Лечебният ефект, който се чувства след 1 - 7 инжекции, се контролира по телесната температура.

Пример 20

Фракцията от нискомолекулни компоненти, получени в пример 16, се подлага на афинитетна хроматография на Кон-А-Сефароза от фирмата "Pharmacia". Колоната с диаметър 2 см и дължина 10 см, запълнена с Кон-А-Сефароза, се подготвя за работа в съответствие с указанията на фирмата.

След промиване с буферен разтвор съдържащ двадесетмилимолярен трис-соленокисел буфер (0,02 М Трис- HCl) рН 7,4 и едно и половина децимолярен натриев хлорид 0,15 М NaCl) Кон-А-Сефарозата се обработва със зареждащ буферен разтвор, съдържащ децимолярен натриево-ацетатен буфер (0,1 М CH_3COONa) рН 6,5, минимоларен калциев хлорид (1 mM CaCl_2), милимолярен натриев хлорид (1 mM CaCl), милимолярен манганов хлорид (1 mM MgCl_2) и едномолярен натриев хлорид (1 М NaCl), а след това повторно се промиват в първия буферен разтвор. Фракцията от нискомолекулни компоненти като в пример 16 след титруване до рН 7,4 се нанася в колоната и се промива с този буферен разтвор до пълното отделяне на неадсорбираните съединения.

Отделянето на въглеродсъдържащи компоненти, афинно свързани с Кон-А-Сефарозата, се извършва с децимолярен натриево-ацетатен буфер (0,1 М CH_3COONa) рН 3,5 във физиологичен разтвор на натриев хлорид. Контролът на елюцията е спектрофотометричен на дължина на вълната 280 nm. Афинноотделената фракция от въглеродсъдържащи компоненти на клетъчните мембрани след неутрализиране на киселинността ѝ с разтвор на натриева основа (NaOH) до рН 7,4 и добавяне на консервант с крайна концентрация 0,08 тегловни % се получава като целеви продукт, съставът на органичните съединения в който и предизвиканата от него специфична активност са дадени в таблици 1 и 2.

Крайният продукт, който съдържа БАС 0,1%, а останалото е пълнител, се използва като лекарствен препарат за лечение на възпаление на яйчниците чрез вътрешномускулни инжекции с доза 0,05 ml/Kg през ден. Лечебният ефект, който се чувства след 6 - 10 инжекции, се контролира по параметрите на възпалителната реакция.

Пример 21

Фракцията от нискомолекулни компоненти, получена в пример 18, се подлага на афинитетна хроматография на Кон-А-Сефароза както в пример 20. Съдържанието на органичните съединения, съдържащи

компоненти на плазматични клетъчни мембрани и количествените показатели на ефектите на БАС са дадени в таблици 1 и 2.

Целевият продукт, който съдържа БАС 0,1%, а останалото е пълнител, се използва като лекарствен препарат за лечение на възпаление на захарна гангрена на крайниците на болните от диабет чрез вътрешномускулни инжекции с доза 0,05 ml/Kg на през 1 – 3 дни. Лечебният ефект, който се чувства след 5-15 инжекции, се контролира по състоянието на тъканите и кръвоносните съдове в крайниците.

Пример 22

За определяне зависимостта на ефективността на заявеното БАС от съдържанието в него на модифицирани компоненти на клетъчни мембрани се използва суровина от животински тъкани, в които са се развивали процеси на ембриогенеза и/или пролиферация, и/или диференциране на клетките, и/или патология, предшестваща и/или съпътстваща регенерацията и/или репарацията на тъканта. Получените тъкани се обработват както в пример 9. Свойствата на целевия продукт, който се получава, тоест при използване на тъкани от всеки посочен вид модификации на клетъчните структури, а именно на клетъчните структури, са дадени в таблица 5.

Анализът на таблица 5 показва, че наличието на имуномодулиращ ефект в заявеното средство и значителното усилване на този ефект зависи от използваната суровина, от която се получават продуктите на хидролизата, съдържащи модифицирани компоненти на клетъчни мембрани.

По този начин като суровина от животинска тъкан, взета именно в стадия на пролиферация и диференциране на клетките, се използват сперматогонии и сперматоцити от семенниците на плъхове, клетки от костен мозък, епителна тъкан от червата на плъхове, а като суровина с процеси на ембриогенеза се използва ембрионна тъкан от плъхове. Като суровина с процеси на патология, която предшества регенерацията, се използва тъкан от черния дроб на плъхове след частична хепатектомия, а като суровина с патология, която съпътства регенерирането – тъкан на регенериращи крайници на аксолотъл, тъкан от черния дроб на плъхове след подкожно инжектиране на въглероден тетрафлуорид (CCl_4).

Едновременно с експерименталните данни в таблица 5 за сравнение са дадени и сведенията за имуномодулиращия ефект, получен при използването като суровина на мускулна и чернодробна интактна тъкан от възрастни мъжки плъхове.

Таблица 5

Разновидности на използваните животински тъкани	Активиране на макрофагите на перитонеалния ексудат на плъхове (in vitro) след въздействие на заявеното БАС-TS, получено от различни тъкани, в % спрямо контролата	
	Усилване на ферментната активност (НСТ-тест)	Усилване на фагоцитната активност по E. Coli
Хепатоцити на интактен черен дроб	55,3 ± 4,7	43,9 ± 4,1
Интактна мускулна тъкан на възрастни животни	62,6 ± 4,8	55,7 ± 4,3
Сперматогонии и сперматоцити на семенници	81,3 ± 5,6	70,2 ± 4,8
Епителиална тъкан от черва	84,5 ± 5,9	73,2 ± 5,4
Хепатоцити от черен дроб след въвеждане на CCl ₄	88,4 ± 5,4	78,8 ± 5,1
Клетки от костен мозък	90,3 ± 6,8	81,6 ± 6,1
Тъкан от регенерируеми крайници на аксолотъл *	92,4 101,1	83, 6 94,1
Ембрионална мускулна тъкан	95,6 ± 6,2	88,2 ± 5,7
Хепатоцити от регенериращ черен дроб на плъхове след хепатектомия	112,4 ± 6,8	104,6 ± 6,2

Различията с контролата са достоверни при $P < 0,05$

* Тъкан, за която приведените в таблицата значения на показателите са получени при конкретно изпълнение на експеримента

Анализът на данните в таблица 5 показва, че имуномодулиращият ефект на заявеното БАС при използване на тъкани, които са взети в стадии на протичане в тях на процеси на ембриогенезата, пролиферацията и патологията, която предшества и/или съпътства регенерацията и/или репарацията, са значително по-високи, отколкото в известните средства, в които се използва суровина от животинска тъкан, в която тези процеси отсъстват.

Освен това се налага изводът, че от тъканите с указаните процеси, най-голям имуномодулиращ ефект има регенериращата се чернодробна тъкан, ембрионалната тъкан и регенериращата тъкан от крайниците на земноводните.

Пример 23

За производство на заявеното средство като суровина се използва регенерираща се чернодробна тъкан от плъхове след 4 - 12 h от хепатектомията, която е извършена по известния метод (G.M.Higgings. R.M.Anderson, Experimental pathology of the liver: Arch. Pathology, -1931-N 12-p.186).

Чернодробната тъкан се обработва като в примери 1, 9 и 16.

Специфичната активност на получените целеви продукти се определя експериментално чрез активиране на репарационните способности на хепатозитите в черния дроб на плъхове след поражение с въглероден тетрафлуорид (CCl_4), при което активността на Na,K - АТ-фазата се възстановява съответно до: $38,6 \pm 3,4\%$ при използване на целевия продукт, получен както в пример 1; $58,6 \pm 4,2\%$ - както в пример 9; и $88,5 \pm 8,6\%$ - както в пример 16 в сравнение с контролната група животни, на които заявеното средство не е прилагано.

Активността на аминотрансферазите в кръвта се възстановява съответно до $71,6 \pm 10,3\%$ за пример 1; $89,2 \pm 6,2\%$ за пример 9; $98,7 \pm 1,3\%$ за пример 16, а концентрацията на калия в хепатоцитите на черния дроб, съответно $28,4 \pm 4,4\%$; $36,8 \pm 5,4\%$ и $71,8 \pm 8,8\%$.

Крайният продукт, който съдържа БАС 0,1%, а останалото е пълнител, се използва като лекарствен препарат за лечение на телета, които са болни от хепатит, чрез вътрешномускулни инжекции с доза 0,05 ml/Kg на всеки три дни. Лечебният ефект се чувства след 4 - 8 инжекции и се контролира по активността на аминотрансферазата и концентрацията на билирубин и азот в кръвта.

Пример 24

Като суровина се използва кюспе от семенници на бикове, получено след отделяне от тях на лидаза чрез екстракция на тъканния хомогенат с 3%-на оцетна киселина.

Полученото кюспе от семенници е отпадък при производството на лидаза. То повторно се хомогенизира в троен обем от физиологичен разтвор с ножови хомогенизатори и се центрофугира с ускорение 250 g в продължение на 15 min за отделяне на неразрушените тъканни елементи. Следващите операции за получаване на целевия продукт са както в примери 1, 9 и 16.

Специфичната активност на получените целеви продукти се определя експериментално чрез активиране на макрофагите на перитоналния ексудат и неутрофилите в кръвта на плъхове. При използването на целевия продукт, получен като в пример 16, ферментативната активност на макрофагите се увеличава до $125,2 \pm 14,1\%$, а фагоцитозната активност по *E.colli* - до $115,4 \pm 10,8\%$. За неутрофилите на кръвта тези показатели се увеличават съответно до $115,4 \pm 14,5\%$ и $83,4 \pm 8,6\%$

Целевият продукт, който съдържа БАС 0,1%, а останалото е пълнител, се смесва с 50 обема вода и се използва като лекарствен препарат - сироп за нормализиране на параметрите на хомеостаза на кокошки. Препаратът се пие от кокошките, които имат отклонения на параметрите от нормата, с доза 5ml/Kg на всеки 2-6 седмици. Лечебният ефект се контролира чрез носливостта, която се повишава с 20-40% в сравнение с контролната група, която не е приемала препарата.

Пример 25

Като суровина се използва планцентна тъкан от крави, която се обработва по същия начин като в примери 1, 9 и 16.

Специфичната активност на получения целеви продукт се определя експериментално по активацията на макрофагите на перитонеалния ексудат и неутрофилите от кръвта на плъхове в сравнение с контролната група. При използването на целевия продукт, който е получен по начина в пример 16, ферментационната активност на макрофагите се увеличава до $183,6 \pm 17,4\%$, а фагоцитозната активност на макрофагите се увеличава до $131,4 \pm 11,8\%$. За неутрофилите на кръвта съответните показатели са $156,1 \pm 17,2\%$ и $111,2 \pm 12,3\%$

Крайният продукт със съдържание на БАС 0,5% и останалото пълнител, се използва като лекарствен препарат за лечение на крави, болни от ендометрит, чрез инжекции, които се осъществяват вътрешномускулно в доза 0,05 ml/Kg на всеки 3-ти ден. Лечебният ефект се появява след 4 - 8 инжекции и се контролира по показателите на възпалителната реакция, хистологичните изследвания и гнойните секрети.

Пример 26

За производство на заявеното средство, като суровина се използва кюспе от тимус, получено след отделяне на неразтворимите компоненти на тъканта от хомогената. Тези неразтворими компоненти са отпадък при производството на тимозин.

Кюспето от тимус се обработва като в примери 1, 9 и 16.

Специфичната активност на получените целеви продукти се определя експериментално чрез симулиране на реакция на бласттрансформация на Т-лимфоцитите, която се увеличава до $212,4 \pm 15,5\%$ в сравнение с контролата при използването на целевия продукт, получен по начина, описан в пример 16.

Крайният продукт, съдържащ БАС от 0,5% и останалото пълнител, се използва интраназално като лекарствен препарат за профилактика на инфекционните заболявания при човека. Във всяка ноздра се капват по две капки от препарата, след което се масажира носът, за да се получи разтичане по слизестата повърхност. Тази процедура се повтаря два пъти дневно. Контролът на ефекта се извършва по общото състояние на организма и температурата на тялото.

Пример 27

Лекарственият препарат на основата на БАС, получено като в примери 1-6, 9-14, 16-21 и 23-26, се приготвя със съдържание на това БАС в него в количество 0,001%. Като пълнител се използва 10% разтвор от захароза. Препаратът се използва за хранване на пчели. Еднократно хранване с 1l от препарата за едно пчелно семейство осигурява в сравнение с контролната група повишение на:

- жизнеността с 100-160%;
- количеството излитания с 150 - 200%;
- количеството събран мед с 35 - 85%.

Пример 28

Лекарственият препарат на основата на БАС, получено както в примерите 1-6, 9-14, 16-21 и 23-26, се приготвя след лиофилно изсушаване на това БАС, което се съдържа в препарата в количество 85,0%. Като пълнител служи антисептик. Препаратът като пудра от лиофилно изсушен прах се използва за лечение на открити рани след изгаряне, травми и ерозия на слизестите тъкани. Използването на препарата ускорява регенераторните процеси от 3 до 10 пъти в сравнение с контролата.

Пример 29

Лекарственият препарат на основата на БАС, получено както в примерите 1-6, 9-14, 16-21 и 23-26, се приготвя с това БАС, което се съдържа в препарата в количество 1,0%. Като пълнител служи гел от растително пюре, краставично, ябълково или прасковено. Препаратът се използва за козметични цели. Лечебният ефект се получава след 2-6 сеанса и се контролира по еластичността на кожата.

Пример 30

Лекарственият препарат на основата на БАС, получено както в примерите 1-6, 9-14 и 16-21 и 23-26, се приготвя с това БАС, което се съдържа в препарата в количество 1,0%. Като пълнител служи гел с основа пчелен мед (15 части), сок от кромид лук (3 части), сок от чесън (1 част) и репейно масло (1 част). Препаратът се използва като маска за укрепване на окосмяването. Гелът се намазва върху космената покривка на главата и престоява 2-3 h. Процедурата се повтаря един път седмично. Лечебният ефект се получава след 3-10 сеанса и се контролира по състоянието на окосмяването.

Пример 31

Лекарственият препарат на основата на БАС, получено както в примерите 1-6, 9-14 и 16-21 и 23-26, се приготвя с това БАС, което се съдържа в препарата в количество 0,1%. Като пълнител служи ланолин в смес със спермацет в съотношение 1:3. Препаратът се използва чрез мазане за възстановяване на кожата след дерматоза. Използването на препарата способства за ускоряването на възстановителните процеси от 3 до 6 пъти в сравнение с контролата.

Пример 32

Лекарственият препарат на основата на БАС, получено както в примерите 1-6, 9-14, 16-21 и 23-26, се приготвя с това БАС, което се съдържа в препарата в количество 0,1%. Като пълнител служи какаово масло. Препаратът се използва като свещички за лечение на ендометрити. Лечебният ефект при използването на препарата се появява на 10-20 ден, което се контролира по показателите на възпалителната реакция, хистологичните изследвания, анализа на кръвта и екстрементите.

Пример 33

Лекарственият препарат на основата на БАС, получено както в примерите 1-6, 9-14, 16-21 и 23-26, се приготвя с това БАС, което се съдържа в препарата в количество 1,0%. Като пълнител служи ланолин в смес с вазелин в съотношение 1:3. Препаратът се използва като крем за лечение на ерозията на слизестите тъкани и способства за ускоряването на възстановителните процеси от 4 до 8 пъти в сравнение с контролата.

МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ ЗА ИЗСЛЕДВАНЕ

Пример 34

Аминокиселинният анализ на състава на БАС, получено както в примери 1-26, се извършва в три направления, при които се определят:

- общият аминокиселинен състав;
- аминокиселинният състав на пептидите и свободните аминокиселини при липса на киселиннонеразтворими белтъци;
- съставът на свободните аминокиселини .

1) Общият аминокиселинен анализ на БАС, получено като в примери 1-26, се извършва чрез хидролиза на средството в 6-нормална солна киселина (6 N HCl) при температура 110° C в продължение на 24 h във вакуум. След приключването на хидролизата пробите се напарват във вакуум над суха натриева основа (NaOH). Сухият остатък се разрежда с двудецинормален (0,2 N) натрий-цитратен буферен разтвор pH 2,2 и се нанася на йонообменните колони в анализатора на аминокиселини.

2) За отделяне на киселиннонеразтворимите белтъчини в 0,5 ml от пробата се добавят 0,5 ml 3%-на сулфосалицилинова киселина и се оставя да престои 1 h, през което време съставът периодично се

разбърква. Денатурираните белтъчини се отделят чрез центрофугиране при ускорение 8000 g в продължение на 15-20 min. Полученият супернатант се подлага на общ аминокиселинен анализ.

3) Съдържанието на свободни аминокиселини в БАС, която е получена като в примери 1-26, се определя след уравновесяване на пробите с двудецинормален (0,2 N) натрий-цитратен буферен разтвор при pH 2,2 и след филтриране през лишен от неорганични примеси хартиен филтър се нанася върху йонообменните колони на анализатора на аминокиселините.

Отделянето на аминокиселините от колоните се извършва чрез натрий-цитратни буферни разтвори с pH 3,35, 4,25 и 5,28. Фракционираният аминокиселини се обработват с нинхидринов реактив и се определя оптичната им плътност чрез промивен фотометър при дължина на вълната 440 и 570 nm.

Пример 35

Съдържанието на общи липиди в БАС, получено като в примери 1-26, се определя, като 0,5 ml БАС се смесва с 1,5 ml концентрирана сярна киселина (H_2SO_4) и се кипва при температура 95°C в продължение на 15 min. След като изстине, към 0,1 ml хидролизат се добавя 1,5 ml фосфованилинов реактив на фирмата "ХЕМАПОЛ" (Чехословакия) в съответствие с известния метод за определяне на общите липиди по специфичното им оцветяване (J.M.Knight, S.Anderson, J.M.Rawle. - Clinical Chemistry, 1972, v.18, p.199). Оптичната плътност на разтвора се определя на вълна с дължина 530 nm.

Пример 36

Анализът на нуклеотидния състав на БАС, получено като в примери 1-26, се извършва, като киселинноразтворимите пуринови и пирамидинови нуклеотиди се екстрахират от 1,5 - 5,5 ml проба чрез 5%-на охладена хлорна киселина ($HClO_4$). След 20 min студена екстракция пробите се центрофугират с ускорение 2500 g за 10 min, утайката се промива три пъти с 5%-на охладена хлорна киселина ($HClO_4$), супернатантите се обединяват и се използват за отделяне на киселинноразтворимите нуклеотиди. Киселинноразтворимата фракция се хидролизира чрез едномоларна хлорна киселина (1M $HClO_4$) при температура 100°C в продължение на 1 h до получаване на пиримидинови монофосфати и пуринови бази. Разтворите се неутрализират с калиева основа (KOH), а продуктите на хидролизата

се разделят чрез катионообменника "ДАУЕКС" 50x4, като се използва стъпално утаяване: чрез дестилирана вода (H_2O) за пикочната киселина и уридин-монофосвата (УМФ); чрез двудецимолярна хлорна киселина ($0,2M\ HClO_4$) за ксантина и цитозин-монофосвата (ЦМФ); чрез четиридецимолярна хлорна киселина ($0,2M\ HClO_4$) за хипоксантина; чрез едномоларна хлорна киселина ($1M\ HClO_4$) за гуанина; чрез двумоларна хлорна киселина ($2M\ HClO_4$) за аденина.

Нуклеотидите се идентифицират по хроматографичната подвижност в катионообменника в сравнение със стандартите, а така също - по спектрите на поглъщане в диапазона 200-300 nm. Количеството нуклеотиди се определя чрез значенията на коефициентите на моларна екстинкция.

Пример 37

Имуномодулиращата активност (свойствата) на БАС, получено като в примери 1 - 26, се определя по активирането на макрофагите на перитонеалния ексудат на плъхове в линия Wister при опити *in vitro*, по засилването на ферментативната активност във възстановяването на нитро-син-тетразолий в диформазин (НСТ-тест) и по усилването на фагоцитозната активност към *E. Coli*.

В коремната кухина на декапитираните животни чрез игла и спринцовка се въвежда 20 ml безцветен разтвор на Хенкс, съдържащ 20 ед/ml хепарин. След 2-3 min масаж на корема се прави надрез и със същата спринцовка се изтегля от кухината въведената течност, която след филтриране през найлонов филтър се центрофугира с ускорение 15 - 200 g в продължение на 15 min. Получената утайка се суспендира в половин обем прясна порция от разтвора на Хенкс и отново се центрофугира при същите условия. Промиването на отделените клетки се извършва 3 - 4 пъти, след което концентрацията на клетките в суспензията достига до 80×10^6 клетки/ml. Съдържанието на макрофаги в тъканния ексудат на всички клетки е 25 - 35%.

Определянето на ферментативната активност на макрофагите на перитонеалния ексудат на плъхове се извършва спектрометрично по възстановяването на нитро-синия тетразолий в диформазин. Утайката от клетки на перитонеалния ексудат на плъхове се разрежда с безцветен разтвор на Хенкс до концентрация 80×10^6 клетки/ml.

Към 50 l клетъчна суспензия се добавят 50 l проба с pH 7,4 и концентрация на пептиди 1,0 mg/ml. Сместа се инкубира за 30 min при температура $37^{\circ}C$ във водна баня при постоянно разклащане.

След това се добавя 50 ml наситен при температура 20°C разтвор на нитро-син тетразолий на фирмата "Reanal" (Унгария) и инкубирането продължава още 30 min. После се добавя 3 ml ацетон и се центрофугира 20 min с ускорение 2000g. Надутаечната ацетонова фракция се фотометрира при дължина на вълната 515 nm

Като контрол за сравнение на ферментативната активност се използва проба с консервант от физиологичен разтвор.

Фагоцитозната активност на клетките на перитонеалния ексудат на плъховете се определя по тяхната способност да прихванат E.Coli.

Към 50 ml клетъчна суспензия се добавят 50 ml проба с pH 7,4 и концентрация на пептиди 0,05 mg/ml. Сместа се инкубира за 30 min при температура 37°C във водна баня при постоянно разклащане. След инкубирането сместа се суспендира в 10 ml безцветен разтвор на Хенкс при температура 4°C и се центрофугира 15 min с ускорение 120 - 200 g. Утайката от клетки на перитонеалния ексудат на плъховете се разрежда с разтвор на Хенкс до концентрация $2,5 \times 10^6$ клетки/ml. Получената суспензия от 0,2 ml се нанася върху стъкло с размери 18x18 mm и се инкубира за 30 min при температура 37°C в 5%-на атмосфера на въглероден двуокис (CO₂) за прикрепяне на макрофагите към стъклото.

След инкубирането, за да се отделят незакрепилите се клетки, стъклото се изплаква 3 пъти в съдове със среда на Хенкс. Към останалите на стъклото клетки се добавя 0,2 ml суспензия E.Coli с концентрация 20×10^6 клетки/ml и се инкубира при същите условия още 45 min. След това стъклото отново се изплаква три пъти, фиксира се с метанол и се оцветява по Романовски-Гимзе.

Индексът на фагоцитоза (ИФ) се определя по формулата:

$$\text{ИФ} = (0 + 2,5n + 6t + 9p + 10r) / \text{количество клетки} \quad (1)$$

където:

- 0 е количество клетки, които не фагоцитират E.Coli;
- n е количество клетки, погълнали 1 - 4 клетки;
- t е количество клетки, погълнали 5 - 7 клетки;
- p е количество клетки, погълнали 8 - 9 клетки;
- r е количество клетки, погълнали 10 и повече клетки.

Идентификацията на макрофагите се извършва по оцветяването на неспецифичната естераза.

Пример 38

Имуномодулиращата активност (свойствата) на БАС, получено като в примери 1 - 26, се определя по активирането на кръвните неутрофили на плъхове в линията Wistar при опити *in vitro* въз основа на усилването на активността при възстановяването на нитро-синия тетразол в диформаза (НСТ-тест) и на усилването на фагоцитозната активност към *E.Coli*.

Кръв от опашната артерия на плъха се събира направо в епруветка с безцветен разтвор на Хенкс и хепарин и се размесва. Към получената смес се добавя 6% декстран Т-500 в отношение 3:1 и епруветките се оставят за 1 h в хладилник. След утаяването на еритроцитите надутаечният слой от левкоцити се отделя с пипетка и се центрофугира при ускорение 250 g в продължение на 15 min. Отделянето на еритроцитите от левкоцитната маса става чрез хемолизация чрез суспензиране на утайката от левкоцити в дестилирана вода, след което се добавя разтвор на Хенкс и разтворът се центрофугира. Утайката от левкоцити отново се суспензира с пресен разтвор на Хенкс и се центрофугира при същите условия. Промиването на левкоцитите се извършва три пъти.

Определянето на ферментационната активност на неутрофилите в кръвта се извършва спектрометрично след възстановяването на нитро-синия тетразол в диформазин.

Утайката от левкоцити от кръвта на плъховете се разрежда с безцветен разтвор на Хенкс до концентрация 80×10^6 клетки/ml. Към 100 μ l клетъчна суспензия се добавя 300 μ l БАС, получено както в примери 1 - 26, рН на което е доведено до 7,4, а концентрацията на пептиди - до 1,0 mg/ml. Сместа се инкубира при температура 37°C във водна баня при постоянно разклащане в продължение на 30 min, след което се добавя 400 μ l разтвор от нитро-син тетразол на фирмата "Reanal" (Унгария) и по-нататъшните операции са като в пример 37.

Фагоцитната активност на кръвните левкоцити на плъховете се определя по тяхната способност да прихващат *E.Coli*.

Към 50 μ l левкоцити се добавя 50 μ l БАС с рН 7,4 и концентрация на пептиди 0,05 mg/ml. Сместа се инкубира, а след това се добавят 10 ml безцветен разтвор на Хенкс при температура 4°C и се центрофугира с ускорение 150 - 200 g за 15 min. Утайката от левкоцити се разрежда с 0,3 ml разтвор на Хенкс и се добавят 0,05 ml суспензия *E.Coli* при концентрация 500×10^6 клетки/ml, а след това се инкубира 30 min при температура 37°C. След

инкубацията се правят обмазки, в които след оцветяването количеството на фагоцитиращи клетки и индексът на фагоцитоза (ИФ) се определят така, както в пример 37.

Пример 39

Имуномодулиращата активност (свойствата) на БАС, получено като в примери 1 - 26, се определя опитно *in vivo* с мишки по линията BALB/C. На животните се правят по две подкожни инжекции от препарата през два дни и с доза по 0,5 ml/Kg при концентрация на пептиди 1,0 mg/ml. Анализът на имуномодулиращите свойства се извършва две денонощия след последната инжекция. Във всеки опит се използват не по малко от 10 животни. Като контрола служат животни, обработени по посочената схема с 0,08% консервант, разтворен във физиологичен разтвор.

За определяне на реакцията на бласттрансформацията на лимфоцитите като Т-клетъчен миоген се използва фитохемалютинин (ФХЛ), а като В-клетъчен митоген - липополизахарид E.Coli (ЛПЗ). Отделените от далака на мишките лимфоцити се инкубират с тези миогени в продължение на 72 h при температура 37°C в атмосфера от 5% въглероден двуокис (CO₂). Нивото на полиферация на клетките се оценява радиометрично чрез включването на ³H-тимидин. За това към културите се добавя ³H-тимидин (3,7 x 10⁴ Bk/проба) и се инкубира в продължение на 3 h. След това пробата се нанася на милипорести филтри ("Синпор" №5, ЧССР), три пъти се промиват със среда 199 и след това с 5% разтвор на трихлороцетна киселина (ТХО) и етанол. Филтрите се изсушават, слагат се във флакони със сцинтилираща течност ЖС-106 и се определя радиоактивността на пробите чрез гайгер-мюлеров брояч "Mark-111".

Пример 40

Имуномодулиращата активност (свойствата) на БАС, получено като в примери 1 - 26, се определя по стимулирането на естествената килърна активност на спленоцитите на мишки при опити *in vivo*. На животните се правят по две подкожни инжекции от препарата през два дни и с доза по 0,5 ml/Kg при концентрация на пептиди 1,0 mg/ml. Анализът на имуномодулиращите свойства се извършва едно денонощие след последната инжекция. Във всеки опит се използват не по-малко от 10 животни. Като контрола служат животни, обработени по посочената схема с 0,08% консервант, разтворен във физиологичен разтвор.

Състоянието на естествената килърна активност на спленоцитите се определя чрез клетките от лимфомата на мишките YAC-12, маркирани с изотопа на хрома ^{51}Cr . Инкубирането се извършва в продължение на 18 h при отношение на клетките-мишени към клетките-ефектори 1:25 ($1 \times 10^5 : 2,5 \times 10^6$ клетки). Специфичното освобождаване на хромния изотоп ^{51}Cr , съответстващо на цитотоксичната активност на ефекторните клетки, се определя по следната формула:

$$^{51}\text{Cr} = \frac{(\text{освободени при експ.}) - (\text{самопроизв. освободени})}{(\text{мах освободени}) - (\text{самопроизволно освободени})} \times 100, \quad (2)$$

където "мах освободени" означава радиоактивността, при която всички клетки са лизирани. Като контрола за определяне на усилването на естествената килърна активност на предлаганите БАС се използва консервант, разтворен във физиологичен разтвор.

Пример 41

Имуномодулиращата ефективност (свойствата) на БАС, получено като в примери 1-26, се определя по функционалната активност на тимуса на мишки при опити *in vivo* в условия, аналогични на пример 39.

Ефектът на въздействието се оценява по титра от типичния серумен фактор (ТСФ). Методът се основава на способността на хормоните от тимуса да възстановяват чувствителността на спонтанните ракови клетки от далака на възрастни тимектомирани мишки към антимиоцитния серум.

Кръвен серум от опитните мишки се пропуска чрез ултрафилтър система "CENTRIFLO CF-50A" на фирмата "Amicon". В реакцията се използва по 0,1 ml неразреден и серийно разреден чрез среда 199 серум. Като контрола служи средата 199.

Далак се взима от мишките след 10 - 14 дни след тимектомията. От него се извличат клетките чрез развлакняване на тъканта чрез препараторни игли в среда 199. След филтриране през капроново сито те се отмиват два пъти чрез среда 199 и центрофугиране с ускорение 4000 g. Утайката се ресуспендира в средата до концентрация 4×10^7 кл./ml и така се получава извлек, 0,1 ml от който се прибавя в епруветки със серум и среда 199.

Съдържанието на епруветките се разбърква чрез пипетиране и се инкубира 60 min при температура 37°C.

След инкубирането във всички епруветки се добавя по 0,1 ml антиtimoцитен серум и комплемент от морско свинче при разреждане 1:10. Извлекът се инкубира още 30 min при температура 37°C. След това към сместа се добавят по 0,1 ml суспензия от еритроцити на овен (12×10^7 кл./ml), разбърква се, центрофугира се 5 min с ускорение 250 g и се инкубира 60 min при температура 4 - 8°C. Утайката в епруветките се ресуспендира в продължение на 5 min. Преброяването на розетките се извършва в камера на Горяев. За розетка се счита лимфоцит, който е присъединил най-малко 4 еритроцити. Чрез титър ТСФ се преброява последното разреждане на серума, предизвикващо 50% редукция на броя на розеткообразуващите клетки (РОК) спрямо контролата. Резултатите се изразяват като логаритъм от титра при основа 2, т.е. като $\log_2 A$ - където А е стойността на титра.

Пример 42

Ефективността на БАС, получено като в примери 1 - 26, която се изразява в усилване на репарационните способности на хепатоцитите от черен дроб на плъхове *in vivo* след подкожно инжектиране на въглероден тетраехлорид (CCl_4), се определя чрез възстановяването на активността на Na,K-АТФаза по следния начин.

На плъхове-самци с тегло 230 - 250 g от линията Wistar ежедневно в продължение на 4 дни подкожно се инжектира въглероден тетраехлорид (CCl_4), смесен с растително масло в отношение 1:1 с доза 4,0 mg/Kg живо тегло. 4 h след първата инжекция с CCl_4 на опитните животни се бие първата от четири подкожни инжекции със средството. Следващите инжекции са през 1 ден. Дозата на всяка инжекция е 0,05 mg/Kg живо тегло. Ефективността на средството се регистрира на следващия ден след последната инжекция. При това като контрола за сравнение се използва черен дроб от животни, който е поразен по аналогичен начин с CCl_4 , но не е третиран с изследваните БАС, а така също - черен дроб на интактни животни.

За определяне на активността на Na,K-АТФазата се използват фракции от клетъчни мембрани на хепатоцити. За това 15 g охладен черен дроб на плъхове се хомогенизира в 150 g едномилимоларен боратен буферен разтвор (1mM $Na_2B_4O_7$) с pH = 7,5 в присъствието на петдецимилимоларен разтвор на калциев хлорид (0,5mM $CaCl_2$),

като се използва ръчен стъклен хомогенизатор с тefлоново чукало. Хомогенизираната смес се центрофугира с ускорение 150 g за 10 - 12 min при температура 4°C. Супернатантата повторно се центрофугира с ускорение 100000 g за 20 min, а получената утайка се изплаква в 130 ml буферен разтвор при същите условия на центрофугиране. След промиването утайката се суспендира в буферен разтвор за анализи с концентрация на белтъци по метода на SDS-Лоури до 3,0 mg/ml.

Всички операции за получаване на фракции от мембрани се извършват на студено.

Активността на Na,K-АТФазата на плазматичната мембрана на хепатоцитите се определя в стандартна среда, състояща се от: шестдесет и шест милимоларен натриев хлорид (66 mM NaCl), тридесет и четири милимоларен калиев хлорид (33 mM KCl), пет милимоларен магнезиев хлорид (5 mM MgCl), двадесет и пет милимоларна (25 mM) Трис-HCl, в която преди опита е добавена пет милимоларна аденозин-три-фосфорна киселина (5 mM АТФ).

Към 1.8 ml от посочената стандартна среда се добавят 0,2 ml суспензия от фракцията на мембраните с концентрация белтъчини 3,0 mg/ml и се инкубира 15 min при температура 37°C. След това реакцията се спира, добавя се 0,6 ml 50% разтвор от трихлороцетна киселина (TXO). Сместа се центрофугира с ускорение 300 - 500g в продължение на 15 min. Към 1,0 ml от получената супернатанта се добавят 4 ml двудецимоларен (0,2M) ацетатен буферен разтвор с pH = 4,0, 0,5 ml 1% разтвор на амониев молибдат в 1% разтвор на сярна киселина (H₂SO₄), 0,5 ml аскорбинова киселина в 16% разтвор на CuSO₄ и след разбъркване се инкубира 10 min при температура 25°C. Оптичната плътност се определя спектрометрично на дължина на вълната 700 nm.

Активността на Na,K-АТФазата се изчислява по разликата между активността на общата АТФаза и на Mg-АТФазата. За определяне на активността на Mg-АТФазата се провеждат аналогични изследвания, но вместо 0,6 ml трихлороцетна киселина (TXO) в сместа се добавя 0,3 ml 0,05% разтвор на строфантин.

Установено е, че при токсично поражение на черния дроб с въглероден тетрахлорид (CCl₄) активността на Na,K-АТФазата се намалява 3,5 пъти, но при използването на заявеното БАС, както в пример 16, нейната активност се възстановява при експериментите най-малко до 80% от нормата. В същите условия известният хепатотропен препарат "Ессенциале", който е промишлен аналог на

заявения препарат, възстановява активността на Na,K-AT Фазата до $43,0 \pm 4,8\%$.

Пример 43

Ефективността на БАС, получено като в примери 1 – 26, която се изразява в усилване на репарационните способности на хепатоцитите от черен дроб на плъхове (*in vivo*) след подкожно инжектиране на въглероден тетраохлорид (CCl_4), се определя чрез възстановяването на активността в кръвта на аминотрансферазите и концентрацията на калия (K) в хепатоцитите от черен дроб на плъхове по следния начин.

За животните, обработени като в пример 42, активността на аминотрансферазите в кръвта се проверява по тест-системата на фирмата "Хемапол" (Чехо-Словакия) в съответствие с фотометричния метод на характерното оцветяване (S.Reitman, S.Frankel. - American Journal of Clinical Pathology, - 1957, №28, p.56).

Към 0,25 ml разтвор, съдържащ децимоларен разтвор (0,1 M) от L-аспартат, двумилимоларен (0,002 M) 2-оксоглутарат и децимоларен (0,1 M) фосфатен буферен разтвор с $\text{pH} = 7,4$, се добавя 0,05 ml кръвен серум от плъхове и се инкубира 60 min при температура 37°C . След края на инкубирането в разтвора се добавя 0,25 ml милимоларен (0,001 M) 2,4-динитрофенилхидразин, разтворен в едномоларна солна киселина (1 M HCl) и пробата се оставя 20 min при стайна температура, след което се добавят 2,5 ml четири децимоларна (0,4 M) натриева основа (NaOH), разбърква се и след 10 min се измерва оптичната плътност при дължина на вълната 520 nm в сравнение с контролния разтвор, където вместо 0,5 ml кръвен серум се добавя 0,05 ml физиологичен разтвор.

Токсичното поражение на черния дроб с CCl_4 се съпровожда с разрушаване на хепатоцитите и съответно с получаване на аминотрансферази, поради което тяхната активност в кръвния серум се повишава два пъти. В същото време използването на заявения БАС както в пример 16 позволява в експеримента да се възстанови тази активност.

Известният хепатотропен препарат "Ессенциале" в същите условия възстановява активността на аминотрансферазата до $87,2 \pm 7,4\%$.

Концентрацията на калия (K^+) в хепатоцитите на черния дроб на експерименталните плъхове се определя по стандартния метод на пламъчна фотометрия по Брикер чрез плазмен фотометър ПФМ-1

(В.Н.Бриккер, Определение содержания К, Na методом пламенной фотометрии - Лабораторное дело, 1961, т.7, с.3-6).

Определено е, че при токсично поражение на черния дроб с CCl_4 активността на Na, K-АТФазата спада 3,5 пъти, а това се съпровожда с понижаване на концентрацията на K^+ в хепатоцитите на черния дроб на плъховете до 40%. В същото време използването на заявеното БАС, получено както в пример 16, позволява да се възстанови концентрацията на K^+ не по-малко от 55%. Известният препарат "Ессенциале" в същите условия възстановява концентрацията на K^+ до $33,0 \pm 6,2\%$.

Пример 44

Стимулирането на регенераторните процеси при използване на БАС, получено както в пример 16, и препарата на негова основа се извършва чрез експериментален модел на стомашна язва на плъхове, предизвикана чрез криогенно въздействие.

На плъхове-самци с тегло 190-200 g под ефирна наркоза се прави лапаротомия на горната третина на стомашната стена, изважда се стомахът и се поврежда неговата слизеста покривка чрез криогенно въздействие в продължение на 10 сек чрез охладена в течен азот метална пръчка с диаметър 7mm по известния метод (Вертелкин В.А., Криогенный способ формирования экспериментальной язвы желудка, - Пат.физиол. и эксперим. тер., 1987, №2, с.77-78). След това стомахът се помещава в стомашната кухина и раната се зашива. На петия ден животните получават язва, която е морфологично подобна на хроничната язва при човека. Тази язва при животните без лечение зараста на 3-4 седмица.

Ефективността на регенераторните свойства на заявеното БАС и на препарата на негова основа се определя по ускоряването на процеса на зарастване на раните по отношение на контролната група животни, които не са лекувани, а така също при сравняване с ефекта, предизвикан от известния биостимулатор "Солкосерил" на фирмата "Алколоид-Скопје" (Югославия), произвеждан по лицензия на "Solco Basel" (Швейцария). Контролът на процеса на регенериране се извършва: биохимично на 5, 15 и 25 денонощие след операцията - по нивото в язвата на малонов диалдехид (МДА); патоморфологично - по разрези на поразения участък от стомаха и измерване на площта на поражение на слизистата.

Нивото на МДА в поразената тъкан на стомаха се определя чрез тиобарбитурова киселина и се изчислява относителната концентрация

на МДА към 1 mg белтък в пробата по известния метод (Стальная И.Д., Современные методы в биохимии, М.1977, с.66-68).

Изучаването на въздействието на регенераторните процеси се извършва с препарата, съдържащ БАС 0,1 тегловни %, а останалото пълнител, получен както в пример 16, а като пълнител се използва сантимоларен фосфатен солен буфер (0,01 M PBS) Рн 7,2.

От петия ден след операцията, когато е била формирана язвата, на животните всекидневно в продължение на 20 дни се правят вътрешномускулни инжекции по групи:

1. Контролна - (0,01 M PBS) с доза 0,5 ml/Kg;
2. Опит - заявеното БАС с доза 0,5 ml/Kg;
3. Опит - заявеното БАС с доза 0,05 ml/Kg;
4. Лекарствен аналог - "Солкосерил" с доза 0,5 ml/Kg.

Интактната група животни служи за еталон при сравняване на нормализирането на параметрите на хомеостаза.

По време на експеримента се забелязва, че на 15 ден препаратът на основата на заявеното БАС с доза 0,05 ml/Kg възстановява нивото на МДА в сравнение с контролната група животни, които не са лекувани, до $80 \pm 12\%$ и остава по-висок от интактните животни с $87 \pm 1,3\%$, а с доза 0,5 ml/Kg - го нормализира до състоянието на интактните животни. В същите срокове "Солкосерил" понижава нивото на МДА до $38 \pm 16\%$ и няма ефект до 25 ден, като остава на нивото в контролните животни, превишавайки нивото на интактните животни до $21 \pm 9\%$. В опитните групи №2 и 3 на 25 ден нивото на МДА е възстановено до нормалното.

Аналогични резултати са получени при патоморфологични изследвания. На 5 ден след операцията площта на повреда на слизистата на стомаха на плъховете е $13,0 \pm 1,0 \text{ mm}^2$, а на 15 ден в контролните животни се намалява до $9,5 \text{ mm}^2$.

В групите от животни №2 и 3 към този срок границите на зоната на поражение се затварят, а в група №4 са размити и слабо изразени.

При хистологични изследвания на разрезите на поразените участъци от стомаха се отбелязва, че в група №2 деструктивните изменения са изразени по-слабо, а репаративните процеси настъпват по-рано, отколкото в останалите групи животни.

Краищата на язвата се затварят за сметка на разрастването на междинната тъкан и нехарактерния за тази област от слизистата на стомаха епител. Дефектът в слизистата повърхност напълно

се замества от структурно пренастроен жлезист паренхим, а гранулната и зрялата съединителна тъкан са умерено изразени.

За "Солкосерил" такъв ефект се появява в по-малка степен и деструктивните нарушения се забелязват не само в слизистата, но и в подслизистата ципа на пилоро-антералната част на стомаха. Срещат се полета с продуктивна възпалителна реакция, богати на клетъчни елементи: фибробласти, плазматични клетки, хистоцити и левкоцити. По тези признаци тази група проявява сходство с контролната група животни.

Така експерименталните данни показват способността на заявеното БАС да стимулира регенераторните процеси, като по ефективност то значително преизхожда промишления аналог - широко известния регенераторен биостимулатор "Солкосерил".

Изобретението не се ограничава с изложените конкретни варианти на изпълнение. Различни варианти могат да се осъществят в рамките на същността и обема, обхванати от патентните претенции.

АНАЛИЗ НА СЪСТАВА И СВОЙСТВАТА НА ЗАЯВЕНОТО БИОЛОГИЧНО АКТИВНО СРЕДСТВО И ПРЕПАРАТА НА НЕГОВА ОСНОВА

Идентифицирането на заявеното БАС между другите биологично активни средства е възможно чрез пряк биохимичен анализ на състава и косвено - по значението на имуномодулиращия ефект, който е присъщ на заявеното средство.

Установено е, че именно наличието на модифицираните компоненти на клетъчни мембрани с модифицирана антигенна структура в състава на заявеното БАС осигурява значително усилване на имунната реакция на организма в сравнение с контролата. Това позволява да се идентифицира заявеното БАС по следния комплекс от показатели:

а) По повишаването до не по-малко от 54% на активността на макрофагите на перитонеалния ексудат на плъховете, а именно по засилването на ферментационната активност на макрофагите, контролирано чрез НСТ-тест (при използването в опитите на нитро-син-тетразол - НСТ на унгарската фирма "Reanal") и по засилването на фагоцитната активност Е.Сс11 до не по-малко от 49%;

б) по повишаването на активацията на неутрофилите в кръвта на плъховете, тоест по усилването на ферментативната активност, контролирана чрез НСТ-тест (при използване в опитите на нитро-син-тетразол НСТ на унгарската фирма "Reanal") и по засилването на фагоцитната активност E.Coli до не по-малко от 52%;

в) по усилването на реакцията на бласттрансформацията на Т-лимфоцитите - не-по малко от 52% и на В-лимфоцитите - не по малко от 69%;

г) по усилването на функционалната активност на тимуса - по съдържанието в кръвта на плъховете на тимусов серумен фаактор (ТСФ) - не по малко от 234%;

д) по увеличаването на естествената килърна активност на спленоцитите на плъховете - не по-малко от 62%;

е) по увеличаването на способността да се стабилизируют плазматичните мембрани на хепатоцитите на черния дроб на плъховете след въвеждане на CCl_4 :

- по възстановяването на Na,K-АТФ фазата - не по-малко от 30%;

- по възстановяването на активността на трансферазата в кръвта на плъховете - не по-малко от 61%;

- по възстановяването на отношението на калия (К) и натрия (Na) в хепатоцитите на черния дроб на плъховете - не по-малко от 20%.

При това като база за сравнение се използва контрола от въвеждан в организма консервант, разтворен във физиологичен разтвор.

Приведената система от показатели на имуномодулиращите и регенераторни ефекти (свойства) на заявеното БАС позволява то да се идентифицира чрез проявяваната биологична активност именно като имуномодулятор и стимулатор на регенераторни процеси.

За заявеното БАС и препарата на неговата основа се наблюдава тенденция към поява на ефект за стимулиране на регенераторните процеси и възстановяване на функционалната активност на органите и тъканите при различна патология, така и за лечение на възпалителни процеси, където неговата ефективност може значително да повиши ефективността на известните БАС и препарати със същото предназначение.

Така активирането на репаративните процеси в условията остро поражение на черния дроб в моделираната система на хепатит,

оказва защитно въздействие на плазматичните мембрани на хепатоцитите със значително намаляване на синдрома на цитолиза (концентрацията на аминотрансферази при използването на БАС както в пример 16 се повишава в кръвта не повече от 5% срещу 110-140% в контролната група). Възстановява се активността на мембранно свързаните ферменти (Na,K - АТФаза) до 75-90% в сравнение с контролата, което в голяма степен нормализира вътрешното и външно клетъчно равновесие K/Na. При тези показатели ефектът на въздействие на заявявания препарат превишава ефекта на въздействие на широко известния хепатотропен препарат "Ессенциале", за който те са съответно 7-20% и 38-48% (примери 42, 43). Препаратът на основата на заявеното БАС значително превъзхожда "Ессенциале" също и по способността да нормализира концентрацията на билирубин, показателите на липидния обмен, антитоксичната функция на черния дроб.

Препаратът на основа заявеното БАС инхибира процесите на прекисно окисление на липидите в мембраните на хепатоцитите в интоксигираните животни и повишава активността на глутатно зависимата антиоксидантна система в кръвта, като при това не променя активността на ферментите за микросомно окисление на черния дроб и съдържанието на цитохрома Р-450.

Заявеното БАС повишава силно не само репарационните, но и регенераторните процеси, подпомагащи възстановяването на масата на органа и заместването на загиналите клетки с клетки от оцелялата част на органа.

Така при експеримента по активирането на процесите на регенерация на черния дроб на плъхове след частична хепатоктомия се констатира, че четири инжекции от препарат на основата на БАС както в пример 16, инжектирани на животните преди операцията през два дни, силно стимулират скоростта на процесите на транскрипция, а така също открояването на активирането на ДНК-полимеразния комплект от ядра на хепатоцити. Заявеният препарат активизира ДНК-полимеразата В, отговорна за репарацията на генетичния апарат на клетката, а при процесите на пролиферация стимулира активността на ДНК-полимеразата А, отговорна за репликацията. Това позволява силно да се повиши скоростта на пролиферацията на клетките и темпа на възстановителните процеси при регенериране на черния дроб.

Значимостта на този ефект трябва да се оценява, като се отчита обстоятелството, че дадената моделна система е достатъчно

строго генетично детерминирана и много трудно се подава на каквато и да е активация.

Активизираните от заявеното БАС вътрешноклетъчни процеси способстват нормализирането на функционалните показатели при патологичните процеси, като при това не нарушава функционалното състояние и структурата на черния дроб в интактните животни.

Това явление до голяма степен се базира на същественото влияние в реализирането на възстановителните процеси на имунната система в организма и преди всичко на системата на мононуклеарните фагоцити (СМФ), където определяща роля имат тъканните макрофаги. За черния дроб такива макрофаги са купферовите клетки, които контролират регенераторните и репарационните процеси в органа.

За тяхното стимулиране са достатъчни няколко инжекции от препарата. След това още на следващия ден се забелязва генерална реакция на всички СМФ клетки и преди всичко на купферовите клетки, което се определя по увеличаването на скоростта на отделяне на чуждите вещества от кръвоносната система. Повишава се антибактериалната активност и завършеност на фагоцитозата на перитонеалните макрофаги и неутрофили в кръвта, което може да има съществено значение за лекуването и профилактиката на бактериалните инфекции и на възпалителните процеси.

Ефектът на стимулиране на регенераторните процеси чрез заявеното БАС и препаратите на негова основа се наблюдава и при лечение на язви, рани, кожната покривка след ранявания и поражения. В това отношение тяхната ефективност превишава аналогичните показатели за неговия промишлен аналог – известния регенераторен биостимулатор "Солкосерил" (пример 44).

Използването на заявеното средство и препарат на неговата основа дава положителни резултати след въвеждането му в организма на животните при лечение на възпалителни процеси. Така при лечение на експериментално предизвикано пролиферативно възпаление чрез модела на "джобна" гранулема по Селие в модификацията на Розен (Методика воспроизведения стандартного асептического воспаления, Пат. физиол. и эксперим. тер., 1961, 5, №6, с.72-76) препаратът на основата на заявеното БАС два пъти по-ефективно от "Солкосерил" потиска формирането на гранулно-фибриозна тъкан и образуването на ексудат.

При лекуване на мастити при кравите оздравяването се наблюдава в 80-93% от случаите, докато при използването на

известните БАС и при използването на антибиотици в съчетание с антивъзпалителния препарат "Мастисан" оздравяване се наблюдава в не повече от 70% от случаите, а при спонтанното излекуване в контролната група – в границите 53-63% от случаите. При лекуване на възпаление на белите дробове на телета са получени следните резултати: при използване на заявеното БАС оздравяване настъпва в 85-95% от случаите; при използване на известните БАС – в 69% от случаите; при лечение с антибиотици и препарата "Бовиверекс" – в 60 – 70% от случаите; в контролната група – в 48 – 61% от случаите. При лечение на ендриометрити при кравите оздравяване се наблюдава в 80 – 95% от случаите, докато при използване на известни БАС, а така също и на антибиотици с препарата "Окситоцин" оздравяването е в не повече от 70% от случаите.

Експериментално са определени имуномодулиращите и регенеративни свойства на известните и заявеното БАС в съответствие с комплекса от показатели, идентифициращи изследваните обекти. Резултатите от експеримента са дадени в табл.6, в която са посочени количествените показатели от ефектите на известните БАС № 1, получени по технология, съответно описана в US-A-4455302, и БАС №2, представено въз основа на публикацията EP-A-0318030, както и на заявеното БАС, представено като групи WS, PM, TS, LM и CW, обобщени по резултати:

WS – примери 1-4 (компоненти на клетъчни мембрани);

PM – примери 5-6 (компоненти на плазматични мембрани);

TS – примери 9-14 (термостабилни компоненти на клетъчни мембрани);

LM – примери 16-19 (нискомолекулни компоненти на клетъчни мембрани с $M \leq 10,0\text{KDa}$);

CW – примери 20-21 (въглеродсъдържащи нискомолекулни компоненти на клетъчни мембрани).

Като контролен обект се използва физиологичен разтвор на натриев хлорид с консервант. Получените резултати са дадени в табл.6 и характеризират чрез сравнение заявеното и известните БАС.

Приведените резултати се отнасят до характеристиките на заявеното БАС, получено като смес с неустановена структура, а така също чрез сведенията, които са необходими за идентификацията му по ефекта, определящ предназначението му.

Таблица 6

Имуномодулиращи регенераторни ефекти на биологично активните средства (БАС)		Количествен показател на ефектите						
		в известните БАС		в заявеното БАС				
		№ 1	№ 2	WS	PM	TS	LM	CW
1. Повишаване на активността на макрофагите на перитонеалния ексудат на плъхове в % спрямо контролата	Ферментативна активност (НСТ-тест)	46,8 ±4,3		70,2 ±8,9	93,6 ±8,3	102,3 ±15,5	172,8 ±28,7	212,4 ±12,3
	Фагоцитна активност E. Coli	33,4 ±4,3		61,4 ±12,1	81,7 ±9,2	92,1 ±14,4	153,6 ±31,8	186,3 ±14,6
2. Повишаване на активността на неутрофилите на кръвта в % спрямо контролата	Ферментативна активност (НСТ-тест)	67,2 ±3,8		84,3 ±9,4	105,2 ±10,7	116,7 ±14,6	148,7 ±19,7	171,3 ±10,3
	Фагоцитна активност E. Coli	44,2 ±5,7		61,1 ±9,0	72,3 ±6,1	76,7 ±9,2	103,2 ±17,4	121,4 ±7,8
3. Стимулиране на реакцията на бласт трансфор- мацията в % спрямо контролата	Т-лимфоцити	42,3 ±4,6		58,6 ±6,2	75,4 ±8,1	83,2 ±17,4	131,7 ±20,3	176,1 ±15,8
	В-лимфоцити	46,3 ±4,7		77,6 ±8,1	101,4 ±17,4	118,8 ±18,4	192,4 ±28,5	243,6 ±18,9
4. Увеличаване на титъра на тимичния серумен фактор (ТСФ) в % спрямо контролата		117,8 ±9,1		310,6 ±76,7	412,7 ±84,5	496,4 ±70,1	764,3 ±94,6	948,7 ±58,9
5. Стимулиране на естествената килърна активност на спленоцитите на плъхове в % спрямо контролата		53,8 ±5,4	62,0 ±30,0	71,8 ±9,7	88,3 ±10,6	101,4 ±12,2	143,6 ±26,4	197,1 ±15,1
6. Усилване на репарационните способности на хепатоцитите за възстановяване на активността след въвеждане на CCl ₄ в % спрямо контролата	Na, K – АТФаза	22,6 ±3,4		35,4 ±5,1	51,2 ±6,2	56,3 ±7,1	86,2 ±7,8	95,7 ±4,3
	Аминотрансфе- раза на кръвта	23,4 ±4,8		71,6 ±10,3	85,3 ±7,1	91,4 ±4,6	96,5 ±3,5	98,1 ±1,9
	Концентрация на K ⁺ в хепатоцитите	14,2 ±3,1		25,4 ±4,7	36,8 ±5,8	41,2 ±5,4	66,7 ±8,7	84,3 ±9,2

Различията с контролата са достоверни при $P < 0,05$

Анализът на данните в табл.6 позволява освен да се идентифицира заявеното средство, да се оцени конкретният резултат, осигурен от него и представляващ съществено подобряване на свойствата на биологичната активност като количествен показател за сметка на наличието в него на компоненти от клетъчни мембрани с модифицирана структура, чието влияние в известните БАС не е намерено.

От анализа на данните в таблица 6 освен това следва, че имуномодулиращият ефект на заявеното БАС съществено нараства в тези случаи, когато то съдържа компоненти от плазматични клетъчни мембрани БАС-PM, компоненти от клетъчни мембрани във вид на термостабилни компоненти БАС-ST, а така също като нискомолекулни компоненти БАС-LM и като въглеродсъдържащи компоненти БАС-CW, при това нарастването на този ефект е от ляво на дясно.

Свойствата на заявеното БАС и препаратa на негова основа са в тясна зависимост от неговия състав.

Както показват резултатите от биохимичния анализ (таблица 7), БАС съдържа в своя състав преди всичко такива органични съединения, като полипептиди, пептиди, аминокиселини, свързани и свободни въглеводороди, липиди, нуклеотиди и други съединения. Данните в табл.7 показват разпределение по маса на органичните съединения в състава на БАС при използване като изходна суровина на ембрионална тъкан от едър рогат добитък. Освен това в табл.7 са отразени резултатите при получаването на различни групи от заявеното БАС (WS, PM, TS, LMQ CW) чрез всички заявени методи. Освен резултатите за възпроизвеждането на метода, който осигурява получаването на БАС-WS и при реализирането на който като суровина се използва животинска тъкан, взета в стадия на процеса на модифициране на антигенната структура на клетъчните мембрани с модифицирани компоненти на плазматични клетъчни мембрани БАС-PM, с нискомолекулни компоненти БАС-PM, с термостабилни компоненти БАС-TS, с нискомолекулни компоненти на БАС-LM и с въглерод съдържащи компоненти на клетъчните мембрани БАС-CW, преимуществено като гликопептиди, гликолипиди, олиговъглеродороди, нуклеотиди и/или свободни моновъглероди.

Данните от табл.6 и 7 позволяват да се направи сравнителен анализ на резултатите от осъществяването на заявления и известния метод за получаване на БАС, а така също на техния състав и свойства.

Таблица 7

Органични съединения	Съдържание на органични съединения в БАС в %						
	в известните БАС		в заявеното БАС				
	№ 1	№ 2	WS	PM	TS	LM	CW
Полипептиди	32,1 ±6,1	43,5 ±6,5	36,5 ±8,0	33,0 ±7,5	20,5 ±6,8	< 0,3	
Пептиди	16,3 ±3,2	-	18,0 ±3,5	18,5 ±3,3	23,4 ±3,1	30,5 ±2,8	32,3 ±3,7
Аминокиселини	31,7 ±6,2	-	15,0 ±2,0	15,0 ±2,1	19,6 ±3,0	24,0 ±7,5	< 0,5
Всичко	80,1 ±5,1	43,5 ±6,5	69,5 ±6,0	66,5 ±5,1	63,5 ±6,8	54,8 ±7,5	33,1 ±3,7
Въглеродороди в състава:							
- високомолекулни с M > 10,0 KDa	1,9 ±0,8	56,5 ±6,5	3,0 ±2,0	1,5 ±0,8	0,9 ±0,5	< 0,2	
- нискомолекулни с M = 0,8 – 10,0 KDa	3,0 ±0,5	-	15,5 ±4,0	20,5 ±4,8	18,7 ±3,7	24,9 ±5,9	49,7 ±8,3
- свободни мономерни с M < 0,8 KDa	10,0 ±2,7	-	4,5 ±1,0	4,0 ±2,5	8,9 ±1,6	7,3 ±1,2	14,0 ±2,1
Всичко	14,9 ±2,7	56,5 ±6,5	23,0 ±7,0	26,0 ±6,8	28,5 ±5,8	32,4 ±5,5	63,9 ±6,1
Липиди, нуклеотиди и други органични съединения	5,0 ±1,6	-	7,3 ±3,0	7,5 ±3,1	8,0 ±2,6	12,8 ±4,2	3,0 ±2,5
Всичко	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
Отношението на съдържанието на въглеродородите и пептидите, G*	0,18	-	0,86	1,11	0,80	0,82	1,54
K*	0,17	-	0,63	0,82	0,91	1,60	2,04
Тегло на сухия остатък от БАС в mg/l	32,6 ±9,6	-	9,3 ±2,2	8,7 ±2,0	7,2 ±1,8	5,2 ±1,6	3,5 ±0,9
Тегло на антисептика в mg/l	-	-	0,7	0,7	0,7	0,7	0,7
Концентрация на БАС в праховата композиция, %	-	-	93,0 ±1,3	92,6 ±1,3	91,1 ±1,7	88,1 ±2,6	83,3 ±3,3

Различията с контролата са достоверни при $P < 0,05$

* Значенията са пресметнати по среднестатистичните значения на величините в таблицата

Сравнителният анализ на специфичната активност на заявеното БАС и известните БАС показва, че тяхната специфична активност зависи от състава им: В известните БАС отношението на **ингредиентите** не осигурява търсения ефект, докато, отношението на **ингредиентите** в заявеното БАС съществено повишава специфичната активност.

Характерно за биохимичния състав на заявеното БАС е наличието в него на въглеродородсъдържащи компоненти, в значителна степен определящи антигенната структура на клетъчните мембрани на тъканите в процесите на модификация. Именно за това съдържанието на въглеродороди в най-активните фракции (фракции 3,4,5 в табл.4) на нискомолекулните компоненти от клетъчните мембрани с молекулно тегло $M=0,8-10$ KDa (оливъглеродороди, гликопептиди, гликолипиди, нуклеотиди) е определящо при идентифицирането и характеризирането на заявеното БАС. Съществен показател в това отношение е съотношението на въглеродороди и пептиди в компонентите с молекулна маса $M=0,8-10$ KDa (табл. 6,7), което се определя по формулата:

$$G = \frac{C_y}{C_n}, \quad (3)$$

където C_y и C_n са концентрациите съответно на въглеродородите и на пептидите в компонентите с молекулно тегло $M = 0,8 - 10$ KDa.

За заявеното БАС значението на този показател е в границите $G_3=0,6-2,0$, докато за известните БАС големината на този показател не превишава значението $G_{из}<0,25$.

По този начин големината на показателя G обобщено характеризира свойството на продуктите от хидролизата и зависи от използваната в заявения метод суровина, от съвкупността на операции в метода за обработка на споменатата суровина и режимите за осъществяване на хидролизните процеси.

Съвкупността на признаците на заявеното БАС и свързаната с нея чрез единен творчески замисъл съвкупност от признаци на заявения метод за получаването му и на заявения лекарствен препарат на неговата основа се намират в причинно-следствена връзка със специфичната активност на БАС.

Необходимо е да се отбележи, че ефективността на крайния продукт зависи от температурно-времените характеристики на процеса на хидролиза и тази зависимост може да бъде изразена графично (виж фигурата). Представените на фигурата криви 1,2 и 3 схематично илюстрират изменението на величината на ефективността на заявеното БАС в зависимост от продължителността t на операцията за хидролиза, провеждана при различни значения на работната температура $T_{p1} > T_{p2} > T_{p3}$.

За крива 2 в интервала от време $t=0$ до $t=t_2$ величината на ефективността $\mathcal{E}$ в заявеното БАС като съвкупност от показатели на неговата специфична активност се увеличава от $\mathcal{E}=0$ до $\mathcal{E}=R_{\max}$, което се обяснява с относителното увеличаване в процеса на хидролизация на дела на нискомолекулните въглеродсъдържащи компоненти с молекулно тегло $M_{yH}=0,8-10$ kDa в състава на крайния продукт при едновременно намаляване на дела на високомолекулните съединения, инхибиращите и баластни съединения.

Във времевия интервал $t=t_2$ до $t=t_4$ ефективността намалява от $\mathcal{E}=R_{\max}$ до $\mathcal{E}=0$ поради това, че продължаването на процеса на хидролизата води до изменение на структурата на въглеродсъдържащите компоненти с молекулно тегло $M=0,8-10$ kDa и преди всичко на гликопептидите поради хидролизата на тяхната пептидна основа, свързваща няколко олиговъглеродни вериги, а така също и в резултат на модифицирането на самите олиговъглероди или появата на неактивни мономерни форми.

Описаните по-горе процеси са температурно зависими и имат ярко изразен максимум, който сумарно се изразява с максимумите на съответните криви 1,2 и 3, т.е. скоростта на протичане на посочените процеси и съответно константите на скоростта в указаните химически реакции силно зависят от величината на работната температура T_p в посочения температурен интервал, в който се осигурява запазване на функционалната активност на ферментите, чрез които се осъществява хидролизата на изходната суровина. При повишаване на температурата T_p максимумите на кривите 1,2 и 3 се преместват наляво към началото на координатите. Затова изборът на работна температура, по-точно на диапазона от работни температури, трябва едновременно да се придружава от избор на интервал от време за протичане на процеса на хидролиза, а именно такъв интервал от време, в който значението на ефективността $\mathcal{E}$ има величина не по-малка от $0,8R_{\max}$, т.е.

$$\varepsilon \geq 0,8R_{\max} \quad (4)$$

Изборът на изходна суровина, продължителността на процеса на хидролиза и поддържането на работната температура, а така също възможността за неговото фиксирано приключване позволяват да се осигури необходимата сравнително висока ефективност ε на заявеното БАС в сравнение с известните БАС.

Освен това изброените условия позволяват да се осигури възпроизводимост на резултатите, т.е. позволяват да се стандартизира получаването на заявеното БАС с определени свойства, а именно със зададена фиксирана специфична активност.

Експериментално е установено, че имуномодулиращите свойства на заявеното БАС и в частност повишаването на активността на макрофагите на перитонеалния ексудат на плъхове *in vitro* зависи от температурно-времевите характеристики на процеса на хидролиза в диапазона от работни температури $T_p=4-45^\circ\text{C}$. Изборът на работна температура в посочения диапазон се осъществява от следните изходни данни:

- при температура $T_p < 4^\circ\text{C}$ значително нараства продължителността на процеса на хидролизата, което намалява икономическата ефективност на заявения метод;

- при температура $T_p > 45^\circ\text{C}$ настъпва понижаване на активността на ферментите, осигуряващи хидролизата на суровината, и се ускоряват процесите на разпад на активните компоненти в целевия продукт. В резултат се намалява качеството на целевия продукт и пада икономическата ефективност на заявения метод.

Трябва да се отбележи, че ефективността на заявеното БАС зависи не само от наличието в него на необходимата действаща субстанция, но и от целия състав на крайния продукт, а следователно и от метода за неговото производство, което показва многоплановостта на оценката на качеството на получаваното средство.

Най-голям принос в имуностимулиращия ефект имат въглеродсъдържащите компоненти в състава на фракциите (3,4 и 5 в таблица 4), молекулното тегло на които е $M_{\text{yH}}=0,8-10 \text{ kDa}$ (олиго-въглеводороди, гликопептиди, нуклеотиди). По-нататък те са условно означени като O_y . Но трябва да се отчита, че влиянието на тези олиговъглеводороди върху имуномодулиращото свойство на заявеното БАС е доста сложно и корелира с няколко ефекта.

Така експериментално е определено, че величината на показателя, който обобщено отразява величината на ефективността, се изразява със следната зависимост:

$$R = F \times (A + B + C) \quad (5),$$

където:

R е показателят, който обобщено характеризира величината на ефективността като съвкупност от показатели на специфичната активност;

F е коефициент, който характеризира степента на модификация на компонентите на клетъчните мембрани от животинската тъкан, използвана като суровина;

A, B, C са функционалните характеристики на съотношенията между ingredientите в състава на БАС. При това:

A е относителната концентрация на въглеродороди в състава на компонентите с молекулна маса $M=0,8-10$ KDa (O_y) към останалите ingredientите в БАС, т.е.:

$$A = \frac{O_y}{\text{ПП} + \text{П} + \text{Амк} + \text{Пу} + \text{Му} + \text{Гл} + \text{Л} + \text{Н}} \quad (6);$$

B е относителната концентрация O_y към ingredientите с молекулна маса $M < 0,8$ KDa, т.е.

$$B = \frac{O_y}{\text{ПП} + \text{П} + \text{Пу} + O_y + \text{Гл}} \quad (7);$$

C е относителната концентрация O_y към ingredientите с молекулна маса $M > 10$ KDa, т.е.

$$C = \frac{O_y}{\text{ПП} + \text{Пу} + O_y} \quad (8),$$

където концентрацията на ingredientите в БАС се изразява чрез:

O_y - "олиговъглеродороди" с молекулно тегло $M=0,8-10$ KDa;

Пу - "поливъглеводороди", т.е. въглеводороди в състава на компонентите с молекулно тегло $M > 10$ KDa;

Му - "моновъглеводороди", т.е. въглеводороди във вид на мономерни или в състава на компонентите с молекулно тегло $M < 0,8$ KDa;

ПП - "полипептиди" с молекуно тегло $M > 10$ KDa;

П - "пептиди" с молекуно тегло $M < 10$ KDa;

Амк - свободни аминокиселини;

Гл - гликолипиди;

Л - липиди;

Н - нуклеотиди.

В съответствие с формула (5) величината на показателя R зависи не само от природата на изходната суровина, използвана за получаване на БАС, и от характеризирания коефициент F, но и от метода за получаване на БАС, определящ значението на сумата

$$A + B + C = K. \quad (9)$$

Тогава формула (5) придобива вида

$$R = F \times K, \quad (10)$$

където K е коефициент, характеризиращ величината на ефективността на заявеното БАС, получено по заявения метод.

Както се вижда от формулите (3-8), величината на показателя K в голяма степен зависи от концентрацията на олиговъглеводороди Оу и на високомолекулни съединения във вид на полипептиди ПП и поливъглеводороди ПУ, чиито значения са представени във всички събирателни на уравненията. Но участието на тези компоненти в специфичността на БАС е разнопосочно и значението на величината на коефициента K нараства с увеличаването на концентрацията на олиговъглеводороди Оу и с намаляването на концентрацията на високомолекулните съединения.

Накрая от анализа на формулите (3-8) следва изводът, че най-същественото относително подобряване на имуномодулиращото свойство на заявеното БАС се осигурява в частните случаи на изпълнението на заявения метод за получаване на това БАС. Обяснението е в това, че след преминаването на всеки следващ стадий от заявения метод се увеличава концентрацията на олиговъглеводороди Оу в заявеното БАС и се намалява съдържанието

в него на високомолекулни съединения като полипептиди ПП и поливъглероди ПУ.

Данните от този характер добре се съгласуват с резултатите от анализа на инградиентите на заявените и известни БАС, значенията на които са дадени в табл.7

От анализа на данните в таблици 2 и 7 се вижда, че значението на показателя К при известното БАС е значително по-ниско отколкото при заявеното БАС. При това величината К добре корелира със съдържанието на олиговъглеродороди Оу и високомолекулни съединения (ПП+ПУ).

За известното БАС №1 (US A 4455302) в табл. 7 концентрацията на олиговъглеродороди е $Oy=3,0\%$, а концентрацията на високомолекулни съединения е $ПП+ПУ=34,0\%$ и значението на показателя К е 0,17. В същото време в заявеното БАС величината на аналогичните показатели на концентрациите (табл.2 и 7) е съответно $Oy=11,5-30,8$; $ПП+ПУ=39,5$, а значението на показателя $K=0,47-1,90$. За БАС полученото от въглеродсъдържащи компоненти значение на концентрациите $Oy=49,7\%$, а $ПП+ПУ$ е по-малко от 0,5% и значението на показателя К е $K=2,20$ (табл.2).

Така имуномодулиращото свойство на заявеното БАС, както следва от анализа на данните в таблици 2 и 7, е много по-високо отколкото в известното БАС. Анализът на данните позволява да се направи и изводът, че при използването на една и съща суровина и, следователно, при едно и също значение на коефициента F, ефективността R на заявеното БАС корелира с величината на показателя К за целевите продукти, получени чрез различни варианти на заявения метод. Този извод се потвърждава от резултатите при изпитанията (таблици 1 и 6).

Така ферментативната активност на макрофагите на перитонеалния ексудат на плъхове съгласно НСТ-теста (виж табл.6) се повишава в сравнение с контролните групи за водоразтворимите компоненти на заявеното БАС до 70%, а за нискомолекулните компоненти - до 170%, т.е. техническият резултат по този показател на специфичната активност се увеличава 2,4 пъти. Аналогично се увеличава 2,5 пъти техническият резултат за фагоцитозната активност на макрофагите. Данните от този вид добре корелират с величината на коефициента К за всеки от продуктите, които се различават 2,6 пъти.

Така достигнатият сравнително по-висок технически резултат за специфичната активност на заявеното БАС е в причинно-следствена

връзка със съвкупността от неговите признаци. Така специфичната активност на заявеното БАС във всички случаи нараства с увеличаването на количеството на реализираните признаци на заявеното БАС (в таблица 6 от ляво на дясно).

ПРОМИШЛЕНА ПРИЛОЖИМОСТ

Изобретенията, които се отнасят до БАС, до метод за получаването му и до лекарствен препарат на основата на заявеното БАС, се базират на избор на изходна суровина, избор на условия за протичане на процеса за получаване на БАС и на препарата с гарантирана висока специфична активност. При това избраната технология за получаване на БАС осигурява възпроизводимост на резултата, т.е. позволява да се стандартизира получаването на заявяваното БАС с определени свойства, а именно с определена фиксирана имуномодулираща активност, определяща фармакологичния, терапевтичния и общобиологичния ефект при използването на изобретението.

Получените **крайни** продукти в общия и частните случаи на осъществяване на заявения метод за получаване на БАС са равноценни по характера на своето биологично въздействие, но се различават по своята специфична активност. Затова **целесъобразността** от използването на едно или друго конкретно БАС се определя от изискванията към обекта, за който са предназначени, т.е. от изискването на ветеринарната и/или хуманната медицина. Поради това във всеки конкретен случай използването на целевия продукт, изборът на един или друг вариант на БАС се определя от съотношението на изискванията към неговата имуномодулираща активност в цяло към себестойността (икономичността) на получаването му. В частност високата ефективност на средството, съдържащо нискомолекулни компоненти с молекулно тегло $M \leq 10,0 \text{ kDa}$ на заявеното БАС-LM, а така също на въглеродсъдържащите компоненти БАС-SW, изцяло се проявява в повишаване на активността на макрофагите, неутрофилите, лимфоцитите, естествените килъри, а това осигурява усилване на регенераторните процеси (табл.6). За селскостопанските животни такива ефекти се съпровождат с увеличение на допълнителния прирост в теглото на животните при интензивно хранене (табл.8). При лечение на респираторни и инфекциозни заболявания (парагрип) това преимущество не е толкова съществено и тук е икономически целесъобразно да се използва средство, съдържащо водоразтворими

компоненти на клетъчните мембрани БАС-WS и БАС-PM. При лечение на възпалителни процеси (мастити, ендометрити и др.) е по-изгодно да се използва средство с термостабилни компоненти на заявеното БАС-ST.

При приготвяне на препарати за външно използване като кремове, свещи, гелове, компреси, интраназално или за пиене от животните вместо БАС-LM икономически е целесъобразно да се използва БАС с термостабилни компоненти БАС-ST.

При това за получаване на максимален ефект заявеното средство и препаратите на негова основа е целесъобразно да се използват за стимулиране на регенераторните процеси и възстановяване на функционалната активност на органите и тъканите при различни патологии, а така също за лечение на възпалителни процеси, където ефективността може значително да превишава ефективността на известните БАС и препарати с аналогично предназначение.

Освен това заявеното БАС и препаратите на негова основа са ефективно средство за лечение на инфекциозни заболявания (парагрип, остри респираторни заболявания при телетата и др.). При неговото използване за лечение на млади животни от едър рогат добитък се наблюдава оздравяване на животните в 88-95% от случаите. В същото време, при използването на известните средства в същите условия, така също при използването на антибиотици и на препарата "Бовиверкс", оздравяването на животните е в не повече от 70% от случаите, а при спонтанно излекуване в контролната група - в границата от 58-67%.

Заявеното БАС повишава резистентността на животните към инфекциозни заболявания и така значително снижава нивото на смъртност.

Използването на заявеното БАС с профилактична цел снижава нивото на заболяванията на телетата от парагрип до 5%, докато при използването на известните БАС нивото на заболяемост на животните достига 12-17%, а в контролната група - 22-28%.

Нормализирането на общобиологичното състояние на селскостопанските животни чрез заявеното БАС подпомага подобряването на производствените показатели и по-специално възстановяването (увеличаването) на допълнителния прираст в живо тегло без влошаване на качеството на месото, като тези показатели се приближават към генетично програмираните при интензивно изхранване. Тази особеност изгодно отличава заявеното БАС и пре-

Таблица 8

Фармацевтичен, терапевтичен и общобиологичен ефект (свойство) при използване на БАС			Количествена характеристика на ефекта			
			Известни БАС	Заявено БАС		
				№ 1	WS	ST
1. Възпалителни процеси	Мастити при кравите	Опит	70 ±5	80 ±5	86 ±5	93 ±5
		Контрола	61 ±5	58 ±8	63 ±7	53 ±8
	Възпаление на белите дробове, % оздравели	Опит	69 ±6	85 ±5	92 ±6	95 ±5
		Контрола	55 ±7	51 ±8	61 ±6	48 ±6
2. Инфекциозни болести	Парагрип и ОРЗ, % оздравели	Опит	70 ±6	88 ±6	94 ±6	95 ±5
		Контрола	64 ±7	58 ±6	61 ±7	67 ±5
3. Увеличаване на допълнителния прираст на телета, % спрямо контролата			24 ±7	54 ±8	70 ±12	145 ±31
4. Остра токсичност ЛД ₅₀ , ml/kg (mg/kg) живо тегло			повече от 25 (260)		повече от 25 (260)	

Различията с контролата са достоверни при $P < 0,05$

паратите на неговата основа от хормоналните и други стимулатори на ръста, които, като повишават количествените показатели, влияят негативно на хомеостазата на животните и снижават качеството на продукцията.

Въвеждането на заявеното БАС и на препаратите на негова основа в организма на животното, имащо отклонения от нормата в параметрите на хомеостазата, осигурява при интензивно хранене увеличаване на допълнителния прираст средно с 52-145% от прираста в контролната група, която не е обработвана със заявеното БАС. В същото време при използването на известните аналози на БАС (№1) в същите условия допълнителният прираст в сравнение с прираста в контролната група е средно 12-24%. Контролната и експерименталната група се формира от 14-18 телета на една и съща възраст и със средно еднакво начално тегло и етиология на отклонението от нормата.

Нормализирането на параметрите на хомеостазата допринася също и за увеличаването на:

- надоя от мляко от едрия и дребен рогат добитък;
- носливостта на домашните птици;
- качествата на кожата на животните с ценна кожа;
- намаляването на смъртността на новородените животни;
- производителността на пчелите и др.

Заявеното БАС и препаратът на негова основа са нетоксични и не предизвикват странични ефекти (алергии и др.)

Заявеният препарат предизвиква повишена стимулация на регенераторните процеси, а именно възстановяване на функционалната активност на чернодробната тъкан при хепатит и регенериране на черния дроб при частична хепатектомия, зарастване на язви, рани и на кожната покривка при ранявания и травми, възстановяване на кръвната формула при големи загуби на кръв и в други случаи.

Сравнителните данни по фармакологичен, терапевтичен и общобиологичен ефект при използването на заявеното БАС и препаратите на негова основа при животните са дадени в табл.8. Анализът на данните в тази таблица показва, че биологичната активност на заявеното БАС значително превишава величината на биологичната активност на аналозите.

Следователно заявеното БАС и препаратът на негова основа притежават широк спектър за приложение във ветеринарната и хуманната медицина и могат да се използват за нормализация на

физиологичните състояния на организма при лекуване на заболявания, контролът на които се извършва в рамките на компетенцията на имунната система в организма.

Въвеждането в организма на заявеното БАС във вид на заявения препарат позволява да се стимулира:

- функционална активност на чернодробната тъкан при хепатит;
- регенериране на черния дроб след хепатектомия;
- зарастване на язви, рани, кожа при наранявания и травми;
- възстановяване на кръвната формула при загуба на кръв;
- излекуването на възпалителни заболявания (мастити, възпаление на белите дробове, ендометрити);
- лекуването на инфекционни заболявания (парагрип, остри респираторни заболявания);
- повишаване на резистентността на животните към инфекционни и възпалителни процеси;
- подобряване на общобиологичното състояние на организма;
- повишаване на прираста в тегло на животните.

Практическото използване на заявеното БАС потвърждава неговата нетоксичност и липсата на странични отрицателни ефекти - алергия, хиперчувствителност от забавен тип.

Липсата на странични ефекти при използването на БАС и на лекарствения препарат на негова основа и данните за фармакологичното, терапевтичното и общобиологичното въздействие на животинския организъм определят възможността за клинично апробиране на БАС и препарата на негова основа.

При изследването на групата от пациенти е налице безспорно положително въздействие върху физиологичното състояние на организма, а така също - пълна аналогия с експерименталните доклинични изследвания на животни.

Методът за производство на заявеното БАС може да бъде реализиран както в промишлени, така и в лабораторни условия.

ПАТЕНТНИ ПРЕТЕНЦИИ

1. Биологично активно средство с имуномодулиращо свойство на основата на представените органични съединения на компоненти на клетъчни мембрани на смляна животинска тъкан, характеризиращо се с това, че съдържа термостабилни, нискомолекулни модифицирани компоненти на клетъчните мембрани с антигенна структура, модифицирана в процесите на ембриогенеза и/или пролиферация, и/или на диференциране на клетките, и/или на патологията преди и/или заедно с регенерацията и/или репарацията на тъканите.
2. Средство съгласно претенция 1, характеризиращо се с това, че съдържа модифицирани компоненти на плазматични клетъчни мембрани с антигенна структура, модифицирана в процесите на ембриогенезата и/или пролиферацията, и/или на диференциране на клетките, и/или на патологията преди и/или заедно с регенерацията и/или репарацията на тъканите.
3. Средство съгласно претенция 1, характеризиращо се с това, че съдържа модифицирани компоненти на клетъчни мембрани, които са термостабилни при $T_H < 120^\circ\text{C}$.
4. Средство съгласно претенция 2, характеризиращо се с това, че съдържа модифицирани компоненти на плазматични клетъчни мембрани, които са термостабилни при $T_H < 120^\circ\text{C}$.
5. Средство съгласно претенция 1, характеризиращо се с това, че съдържа модифицирани компоненти на клетъчни мембрани с молекулно тегло $M = 0,8 - 10 \text{ KDa}$.
6. Средство съгласно претенция 2, характеризиращо се с това, че съдържа модифицирани компоненти на плазматични клетъчни мембрани с молекулно тегло $M = 0,8 - 10 \text{ KDa}$.
7. Средство съгласно претенция 3, характеризиращо се с това, че съдържа модифицирани компоненти на клетъчни мембрани с молекулно тегло $M = 0,8 - 10 \text{ KDa}$.
8. Средство съгласно претенция 4, характеризиращо се с това, че съдържа модифицирани компоненти на плазматични клетъчни мембрани с молекулно тегло $M = 0,8 - 10 \text{ KDa}$.
9. Средство съгласно претенция 5, характеризиращо се с това, че съдържа въглеродсъдържащи модифицирани компоненти на клетъчни мембрани.
10. Средство съгласно претенция 6, характеризиращо се с това, че съдържа въглеродсъдържащи модифицирани компоненти на плазматични клетъчни мембрани.

11. Средство съгласно претенция 7, характеризиращо се с това, че съдържа въглеродсъдържащи модифицирани компоненти на клетъчни мембрани.

12. Средство съгласно претенции от 1 до 11, характеризиращо се с това, че съдържа органични съединения в следните тегловни отношения в %:

Пептиди	- 28,0 - 60,0
Аминокиселини	- 0,5 - 31,5
Въглеводороди	- 16,0 - 70,0
Липиди, нуклеотиди и други органични съединения	- 0,5 - 17,0.

13. Средство съгласно претенция 12, характеризиращо се с това, че съдържанието на въглеводороди в органичните съединения е при следните тегловни отношения в %:

- Високомолекулни съединения с молекулно тегло $M_{ув} > 10 \text{ KDa}$	- до 3,0
- Нискомолекулни съединения с молекулно тегло $M_{ун} = 0,8 - 10 \text{ KDa}$	- 11,5 - 57,9
- Свободни мономери с $M_{ум} < 0,8 \text{ KDa}$	- 3,5 - 17,0

14. Средство съгласно претенции от 1 до 11, характеризиращо се с това, че отношението G на тегловното съдържание на въглеводородите и пептидите в органичните съединения с молекулно тегло $M_{ун} = 0,8 - 10 \text{ KDa}$ е от 0,6 до 2,0.

15. Средство съгласно претенции 1 или 2, 3, 4, 6, 9, 10, характеризиращо се с това, че то съдържа органични съединения в следното тегловно отношение, %:

Пептиди	- 40,0 - 60,0
Аминокиселини	- 12,9 - 17,1
Въглеводороди	- 16,0 - 32,8
Липиди, нуклеотиди и други органични съединения	- 4,4 - 10,6.

16. Средство съгласно претенции 3 или 4, 7, 8, 11, характеризиращо се с това, че то съдържа органични съединения в следното тегловно отношение, %:

Пептиди	- 34,0 - 50,1
Аминокиселини	- 16,6 - 22,6
Въглеводороди	- 22,7 - 34,2
Липиди, нуклеотиди и други органични съединения	- 5,4 - 10,6.

17. Средство съгласно претенции от 5 до 9, или 11, характеризиращо се с това, че то съдържа органични съединения в следното тегловно отношение, %:

Пептиди	- 28,0 - 33,6
Аминокиселини	- 16,5 - 31,5
Въглеводороди	- 26,9 - 37,9
Липиди, нуклеотиди и други органични съединения	- 8,6 - 17,0.

18. Средство съгласно претенция 9 или 11, характеризиращо се с това, че то съдържа съединения в следното тегловно отношение, %:

Пептиди	- 29,0 - 36,3
Аминокиселини	по-малко от 0,5
Въглеродороди	- 57,7 - 70,0
Липиди, нуклеотиди и други органични съединения	- 0,5 - 5,5.

19. Метод за получаване на биологично активно средство с имуномодулиращо свойство, при който се осъществява смилане и хомогенизиране на суровина от животинска тъкан, а от хомогената се отделя утайка, съдържаща клетъчни мембрани, от която чрез ресуспендиране се получават компоненти на клетъчни мембрани, характеризиращ се с това, че като суровина се използва животинска тъкан, която е модифицирана в процеса на ембриогенеза и/или пролиферация, и/или на диференцирането на клетките, и/или на патологията, предшестваща и/или съпътстваща регенерацията, и/или репарацията на тъканите, а нейният хомогенат се пречиства от неразрушени елементи тъкан чрез филтриране и/или центрофугиране при ускорение 150-250 g в продължение на 10-15 min и се отделя утайка, съдържаща клетъчни мембрани, която се хидролизира, продуктите на хидролизата се филтрират и/или центрофугират с ускорение над 1500 g в продължение на 20-40 min с отделяне на супернатанта от продукти на хидролизата, съдържаща компоненти на клетъчните мембрани като краен продукт.

20. Метод съгласно претенция 19, характеризиращ се с това, че като суровина се използва тъкан, избрана от реда: ембрионална тъкан, тъкан от диференциращи се тимоцити на тимуса, сперматогони и сперматоцити на семенници, плацентна тъкан, епителна тъкан от черва, клетки от костен мозък, регенерираща кожна тъкан, тъкан от регенериращ черен дроб, тъкан от регенериращи крайници на земноводни, патологично изменена тъкан, взета преди стадия на регенериране, както и всяка тяхна комбинация.

21. Метод съгласно претенция 19, характеризиращ се с това, че утайката, съдържаща клетъчни мембрани, се отделя от пречистения хомогенат чрез центрофугиране при ускорение 1500-90000 g и/или филтриране през филтър с размер на порите $F < 1 \mu m$ със следващо промиване чрез ресуспендиране и повторно центрофугиране и/или филтриране до получаване на утайка, съдържаща клетъчни мембрани в количество, не по-малко от 60 % тегл. от представените в утайката органични съединения.

22. Метод съгласно претенция 19, характеризиращ се с това, че утайката, съдържаща клетъчни мембрани, преди хидролизата допълнително се центрофугира с ускорение 20000-100000 g в продължение на 12 h в градиент на плътност с отделяне на плазматични клетъчни мембрани.

23. Метод съгласно претенция 19, характеризиращ се с това, че хидролизата се извършва при температура $T_p = 4-45^{\circ}\text{C}$.

24. Метод съгласно претенция 19, характеризиращ се с това, че хидролизата се извършва в присъствието на консервант.

25. Метод съгласно претенция 19 или 20, 21, 22, 23, 24, характеризиращ се с това, че супернатантата от продуктите от хидролизата, съдържаща компоненти на клетъчни мембрани, се подлага на термообработка при температура $T_H = 60-120^{\circ}\text{C}$ до пълното денатуриране на термонестабилните съединения и допълнително се филтрира и/или центрофугира при ускорение, по-голямо от 1500 g в продължение на 20-40 min, при което се отделя супернатанта, съдържаща термостабилни компоненти на клетъчните мембрани като краен продукт.

26. Метод съгласно претенция 19 или 20, 21, 22, 23, 24, характеризиращ се с това, че продуктите от хидролизата, съдържащи компоненти на клетъчни мембрани, преди филтрирането и/или центрофугирането се подлагат на термообработка при температура $T_H = 60 - 120^{\circ}\text{C}$ до пълно денатуриране на термонестабилните съединения.

27. Метод съгласно претенция 19 или 20, 21, 22, 23, 24, характеризиращ се с това, че супернатантата от продуктите на хидролизата, съдържащи компоненти на клетъчни мембрани, се подлага на фракциониране чрез диализа през полупропусклива мембрана и/или чрез ултрафилтрация, и/или гелфилтрация, при което като краен продукт се отделя фракция от нискомолекулни компоненти с молекулно тегло $M < 10 \text{ KDa}$.

28. Метод съгласно претенция 19 или 20, 21, 22, 23, 24, характеризиращ се с това, че продуктите от хидролизата, съдържащи компоненти на клетъчни мембрани, се подлага на фракциониране чрез диализа през полупропусклива мембрана и/или чрез ултрафилтрация, и/или гелфилтрация, при което като краен продукт се отделя фракция от нискомолекулни компоненти с молекулно тегло $M < 10 \text{ KDa}$.

29. Метод съгласно претенция 25, характеризиращ се с това, че супернатантата от продуктите на хидролизата, съдържащи компоненти на клетъчни мембрани, се подлага на фракциониране чрез диализа през полупропусклива мембрана и/или чрез ултрафилтрация, и/или гелфилтрация, при което като краен продукт се отделя фракция от нискомолекулни компоненти с молекулно тегло $M < 10 \text{ KDa}$.

30. Метод съгласно претенция 25, характеризиращ се с това, че нискомолекулната фракция от продуктите от хидролизата, съдържаща компоненти на клетъчни мембрани, се подлага на афинитетна хроматография с лектини за отделяне на фракция, съдържаща въглеродсъдържащи компоненти като краен продукт.

31. Метод съгласно претенция 29, характеризиращ се с това, че нискомолекулната фракция от продуктите на хидролизата, съдържаща компоненти на клетъчните мембрани, се подлага на афинитетна хроматография с лектини за отделяне на фракция, съдържаща въглеродсъдържащи компоненти като краен продукт.

32. Препарат за нормализиране на физическото състояние на организма на човека и животните, съдържащ биологично активно средство на основата на представените органични съединения от компоненти на клетъчни мембрани от жива тъкан и пълнител, характеризиращ се с това, че като биологично активно средство съдържа в състава си продукти от хидролизата на термостабилни, нискомолекулни модифицирани компоненти на клетъчни мембрани с антигенна структура, модифицирана в процеса на ембриогенеза и/или пролиферация, и/или на диференцирането на клетките, и/или на патологията, предшестваща и/или съпътстваща регенерацията, и/или репарацията на тъканите, като съдържанието му в препарата е 0,001 – 85%, а останалото е пълнител.

33. Препарат съгласно претенция 32, характеризиращ се с това, че биологично активното средство съдържа органични съединения в следните съотношения, %:

Пептиди	- 28,0 - 60,0
Аминокиселини	- 0,5 - 31,5
Въглеводороди	- 16,0 - 70,0
Липиди, нуклеотиди и други органични съединения	- 0,5 - 17,0.

34. Препарат съгласно претенция 33, характеризиращ се с това, че биологично активното средство съдържа органични съединения в следните отношения, %:

Пептиди	- 40,0 - 60,0
Аминокиселини	- 12,9 - 17,1
Въглеводороди	- 16,0 - 32,8
Липиди, нуклеотиди и други органични съединения	- 4,4 - 10,6.

35. Препарат съгласно претенция 33, характеризиращ се с това, че биологично активното средство съдържа органични съединения в следните отношения, %:

Пептиди	- 34,0 - 50,1
Аминокиселини	- 16,6 - 22,6
Въглеводороди	- 22,7 - 34,2
Липиди, нуклеотиди и други органични съединения	- 5,4 - 10,6.

36. Препарат съгласно претенция 33, характеризиращ се с това, че биологично активното средство съдържа органични съединения в следните отношения, %:

Пептиди	- 28,0 - 33,6
Аминокиселини	- 16,5 - 31,5
Въглеводороди	- 26,9 - 37,9
Липиди, нуклеотиди и други органични съединения	- 8,6 - 17,0.

37. Препарат съгласно претенция 33, характеризиращ се с това, че биологично активното средство съдържа органични съединения в следните отношения, %:

Пептиди	- 29,0 - 36,3
Аминокиселини	по-малко от 0,5
Въглеродороди	- 57,7 - 70,0
Липиди, нуклеотиди и други органични съединения	- 0,5 - 5,5.

38. Препарат съгласно претенция 33 или 34, 36, 37, характеризиращ се с това, че като пълнител съдържа физиологичен разтвор на натриев хлорид и/или солен буферен разтвор и/или въглеродородни съединения, и/или мазнини от минерален, животински, растителен или синтетичен произход и техните смеси.

39. Препарат съгласно претенция 33 или 34, 36, 37, характеризиращ се с това, че допълнително съдържа консервант.

40. Метод за нормализиране на физиологичното състояние на човека и животните, в който в организма се въвежда препарат на основата на органични съединения от клетъчни мембрани от животинска тъкан, характеризиращ се с това, че като препарат се използва състав от 0,001 - 85,0 % биологично активно средство, съдържащо в състава си модифицирани компоненти на клетъчни мембрани с антигенна структура, модифицирана в процеса на ембриогенеза и/или пролиферация, и/или на диференцирането на клетките, и/или на патологията, предшестваща и/или съпътстваща регенерацията, и/или репарацията на тъканите и пълнител от 15,0 до 99,999%, а въвеждането на препарата в организма става чрез мускулни инжекции с доза 0,005 - 0,5 mg от споменатото средство за един kg тегло с интервал между инжекциите 1 - 7 дни и/или чрез инхалации с доза 0,012 - 0,12 mg за 1 kg тегло с интервал между инхалациите 4 - 48 h, и/или сублингвално въвеждане с доза 0,012 - 0,12 mg за 1 kg тегло с интервал 4 - 48 h, или чрез пиене с доза 0,02 - 1,0 mg за един kg тегло с интервал 1 - 10 дни, и/или вътрешно въвеждане чрез хапчета с доза 0,02 - 1 mg за 1 kg тегло с интервал 1 - 10 дни, и/или интраназално въвеждане с дневна доза 0,001 - 0,05 mg за 1 kg тегло с интервал 2 - 24 h, и/или приложение върху слизеста или ранена повърхност под формата на компреси, свещи, пудри, кремове, гелове с интервали между използването 1 - 10 дни до нормализиране на параметрите на физиологичното състояние.

Приложение: 1 фигура

ЛИТЕРАТУРА

1. FR 2413912
2. US 4455302
3. SU 1442064
4. EP 0106285
5. EP 0157427
6. EP 0318039
7. SU 904707
8. Berman, H.M., W. Gram, M.A. Spirtes, "Biochemistry et biophysical acta", 1969, v. 183, 1, p. 10-18.
9. Gurd, J., W. Evans, H. Perkins, "Biochemistry Journal", 1973, v. 135, 4, p. 827-832.
10. Schapira, G., J. Dobocz, "Biochemistry et biophysical acta", 1974, v. 345, № 3, p. 348-358.
11. Higgins, G. M., R. M. Anderson, Experimental pathology of the liver, "Arch. Pathology", 1931, № 12, p. 186.
12. Laemmli, U. K., "Nature", 1970, v. 227, 5259, p. 680-685.
13. Seifter, S., S. Dayton, C. Hovic, "Arch. Biochemistry and Biophysical", 1950, v. 25, № 1, p. 191-200.
14. Knight, J. M., S. Anderson, J. M. Rawle. "Clinical Chemistry", 1972, 18, p. 199.
15. Reitman, S., S. Frankel, "American Journal of Clinical Pathology", 1957, v. 28, p. 56.
16. Бриккер, В. Н., Определение содержания К, Na методом пламенной фотометрии, "Лабораторное дело", 1961, 7, с. 3-6.
17. Вертеякин, В. А., Криогенный способ формирования экспериментальной язвы желудка, "Пат. физиол. и эксперим. тер.", 1987, № 2, с. 77-78.
18. Стальная, И. Д., Современные методы в биохимии, М., 1977, с. 66-68.
19. Розен, В. Б., Методика воспроизведения стандартного асептического воспаления, "Пат. физиол. и эксперим. тер.", 1961, № 5, № 6, с. 72-76.

Издание на Патентното ведомство на Република България
1113 София, бул. "Д-р Г. М. Димитров" 52-Б

Експерт: Ст. Стефанова

Редактор: Н. Божинова

Пор. № 38712

Тираж: 40 3С

