

(19)



(10) **LT 4102 B**

(12) **PATENTO APRAŠYMAS**

(11) Patento numeris: **4102**

(51) Int. Cl.⁶: **A61K 35/12**

(21) Paraiškos numeris: **95-013**

A61K 35/56

A61K 35/48

(22) Paraiškos padavimo data: **1995 02 03**

A61K 35/50

A61K 35/407

(41) Paraiškos paskelbimo data: **1996 08 26**

A61K 35/38

A61K 38/02

(45) Patento paskelbimo data: **1997 01 27**

(72) Išradėjas:

Alexandr Nikolaevich Nikolaenko, UA

Dmitry Borislavovich Shorokh, UA

Alexandr Alexandrovich Shevchenko, UA

(73) Patento savininkas:

Alexandr Nikolaevich Nikolaenko, ul. Fuchika 7-13, 252049 Kiev, UA

(74) Patentinis patikėtinis:

Otilija Klimaitienė, 35, A. Stanevičiaus g. 56-36, 2029 Vilnius, LT

(54) Pavadinimas:

Biologiškai aktyvi medžiaga, turinti imunomoduliuojančių savybių, jos gavimo būdas, gydomasis preparatas žmogaus ir gyvūnų fiziologinės būklės normalizavimui

(57) Referatas:

Biologiškai aktyvi medžiaga (BAM), pasižyminti imunomoduliuojančiomis savybėmis, turinti susmulkinto gyvulio audinio ingredientų vandenyje tirpių organinių junginių hidrolizės produktų; hidrolizės produktų sudėtyje turi termostabilius, žemamolekulinius morfoplazmos ir glikokalikso ląstelių komponentus (MGLK), modifikuotus embrionenezės ir/arba proliferacijos ir/arba ląstelių diferenciacijos, ir/arba patologijos, lydimas ir/arba jau po įvykusios audinių regeneracijos ir/arba reparacijos, procesuose.

Biologiškai aktyvios medžiagos, turinčios imunomoduliuojančių savybių, gavimo būdas apima plautos žaliavos susmulkinimo, gautų ingredientų hidrolizės, hidrolizės produktų filtracijos ir supernatanto išskyrimo operacijas. Žaliavai naudojami modifikuoti MGLK ir prieš hidrolizę atliekama jos homogenizacija ir valymas nuo nesuirusių audinio elementų.

Preparatas žmonių ir gyvūnų fiziologinei būklei normalizuoti susideda iš BAM ir užpildo. BAM hidrolizės produktų sudėtyje turi termostabilius žemamolekulinius modifikuotus MGLK 0,001-85 %, o likusi dalis - užpildas.

Preparatas panaudojamas žmonių fiziologinei būklei normalizuoti farmaciškai efektyviu kiekiu.

Išradimas skirtas farmacinės chemijos pramonei, būtent aktyvių medžiagų, turinčių imunomoduliuojančių savybių sukūrimas ir jų panaudojimas medicinoje ir veterinarijoje žmonių ir gyvūnų fiziologinei būklei harmonizuoti, gyvūnų produktyvumui skatinti.

Biologiškai aktyvi medžiaga pagal šį išradimą priskiriama gyvulinės kilmės medžiagoms, kurių sudėtyje yra organiniai junginiai. Žmogaus ir gyvūnų organizme esantys įvairios kilmės patologiniai sutrikimai sukelia fiziologinės būklės parametrų nukrypimus nuo normos. Šiuo atveju gydymas, tame tarpe ir/arba profilaktika pasireiškia fiziologinės būklės parametrų palaikymu (jeigu jie nukrypę nuo normos), tokiu poveikiu veikiamas į organizmą, kad jie normalizuotųsi.

Išradimų grupė apima biologiškai aktyvią medžiagą, jos gavimo būdą ir jos preparatą, naudojamą organizmo fiziologinei būklei normalizuoti.

Normalizuoti žmogaus ir gyvūnų fiziologinę būklę galima dviem kryptim, pirma tiesiogiai veikiant į patologijas, ir antra, betarpiškai veikiant sistemas, organus ir organizmo audinius atsakančius už homeostazės parametrų palaikymą normoje.

Hormoninių preparatų, mediatorių, augimo stimuliatorių įvedimas, chemoterapija ir panašios priemonės tiesiogiai veikia ląsteles - taikinius receptijos pagalba.

Pavyzdžiui, diabeto gydymui skiriamas insulinas atstatantis kasos funkcijas; esant nervų sistemos funkciniam pažeidimui skiriami neuromediatoriai, normalizuojantys neuronų ribinį jautrumą ir atitinkamai gerinantys nervinių impulsų perdavimą; esant organizmo imuninės sistemos funkciniam sutrikimui naudojami imunomediatoriai koreliuojantys imuninius atsakymus.

Ligų gydymas tarpiniu veikimu į organus pasiekimas vidinių organizmo resursų mobilizacijos dėka.

Vykstant procesams, susijusiems su organų ir audinių regeneracija, vykstant uždegiminiams procesams stimuliuojama organizmo imuninė sistema.

Organizmo imuninė sistema stimuliuojama vykstant procesams susijusiems su audinių ir organų regeneracija, jų reabilitacija, taip pat esant uždegiminiams ir infekciniams procesams. Dėka to pagerėja imuninė ir bendra organizmo būklė.

Žinoma biologiškai aktyvi medžiaga, gauta iš gemalinės medžiagos, pasižyminti imunomoduliuojančiu veikimu, atstatanti organizmo fiziologinę būklę ir reguliuojanti ląstelių pasikeitimą (FR - A - 2413912). Biologiškai aktyvi medžiaga (toliau BAM) gauta iš tokių sudėtinių dalių - susmulkinto ir homogenizuoto gyvulinio audinio, išskirto iš gemalo ir sumaišyta su fiziologiniu serumu.

Kadangi medžiaga pasižymi palyginti aukštu imunomoduliuojančiu veikimu, jos panaudojimas normalizuoja fiziologinę būklę, gydo, padidina gyvūnų produktyvumą, palyginus su kontroline grupe 5-15%

Žinomos BAM efektyvumas yra nepakankamas dėl to, kad kartu su imunomoduliuojančiais faktoriais savo sudėtyje turi imunodepresantų, kurie kliudo pilnam imunomoduliuojančiam efektui pasireikšti. Nurodytos medžiagos imunomoduliuojantis veikimas iš esmės yra rezultatas kartu veikiančių joje imunomoduliuojančių faktorių ir depresantų. Tokiu būdu, specifinis žinomos BAM aktyvumas, priklausantis nuo imunomoduliuojančių faktorių ir depresantų koncentracijų santykio, palyginti nedidelis dėl žymios depresantų koncentracijos jos sudėtyje.

Kitas žinomos BAM trūkumas yra padidintas kiekis jo sudėtyje stambiamolekulinių junginių, kurie yra imunogenai, iššaukiantys šalutines imunines reakcijas (alergiją, sulėtinto veikimo hiperjautrumą ir t.t.)

Aukščiau parašytos žinomos BAM trūkumai žymia dalimi priklauso nuo medžiagos gavimo būdo, kur technologinis procesas baigiasi žaliavos iš gyvulinio audinio smulkinimo ir homogenizacijos operacija, dėl ko būtinai jos sudėtyje atsiranda didelis kiekis depresantų ir stambiamolekulinių junginių.

Taip pat žinoma BAM, turinti imunomoduliuojančių savybių, normalizuojanti fiziologinę organizmo būklę, gaunama iš susmulkinto ir homogenizuoto audinio, išskirto iš gyvūnų gemalinio audinio ekstrakto pavidale (EP-A-0249563).

BAM gaunama sekančiais etapais: gyvulinio audinio susmulkinimas ir homogenizacija, netirpių junginių pašalinimas ir ekstrahuotos ištirpintos medžiagos panaudojimas kaip galutinio produkto (EP-A-0249563).

Medžiagos, gautos aprašytu būdu, specifinis aktyvumas pasireiškia kaip rezultatas tų imunostimuliuojančių ir imunoinhibuojančių efektų rezultatas, taip pat yra nepakankamas.

Gavimo būdas pasižymi tuo, kad ekstrakte yra tik tirpūs baltymai, o struktūriniai baltymai pašalinti, kas žymiai sumažina imunostimuliuojančių faktorių kiekį medžiagos sudėtyje.

Taip pat žinoma BAM, gauta iš susmulkinto ir homogenizuoto gyvulinio audinio, gauto ekstrakto pavidale iš audinio organų, sudarančių imuninę sistemą (užkrūčio liaukos, blužnies ir limfmazgių), termo-stabilių komponentų arba hormonų gaminančių audinių (placenta) organizmo būklei normalizuoti, tame tarpe gyvulių rezistentiškumui ir produktyvumui padidinti (SU-A-1442064).

Žinoma BAM skirta imuninės T-sistemos reguliavimui ir ją panaudojant praktiškai neiššaukiamos jokios imuninės reakcijos (alergija, lėto veikimo hiperjautrumas ir t.t.). Jos specifinis aktyvumas, palyginus su jau paminėtomis BAM, yra aukštesnis dėl pasireiškiančio kiekio imunostimuliuojančių faktorių.

Panaudojama žaliava, o taip pat prieš hidrolizę operacijų, skirtų jos homogenizacijai ir išvalymui nuo nesuardytų audinio elementų ir iš to sekančiu supernatanto turinčio ingredientų su morfoplazmos ir glikokalikso ląstelių komponentais, nebuvimas neleidžia gauti galutinio produkto su paminėtų komponentų aukštomis (>30%) koncentracijomis, o taip pat sumažinti imunodepresantų, neutralių ir balastinių junginių kiekį.

Žinomas vaistinis preparatas žmogaus ir gyvulių fiziologinei organizmo būklei normalizuoti iš gyvulio audinio sudėtinių hidrolizės produktų dalių, išreikštų organiniais junginiais, kuris uždedamas ant pakenktų kūno vietų

(US-A-4455302). Be išvardintų trūkumų vaistinio preparato iš žinomos BAM yra tai, kad organizmo imuninės sistemos stimuliacija galima tikrai lokaline aplikacija ant traumuotų kūno vietų. Todėl tokio preparato aktyvumas yra palyginti nedidelis. Nurodyti trūkumai dalinai pašalinti žinomame preparate, pasižyminčiame imunomoduliuojančiu veikimu, skirtu žmogaus ir gyvūnų organizmo fiziologinės būklės normalizavimui, turinčiam veikiančią medžiagą, kuri yra biologiškai aktyvi medžiaga, sudaryta iš gyvulio audinio sudėtinių dalių hidrolizės produktų ir užpildo, kuri įvedama injekcijų pavidale į organizmą per raumenis 0,75-1,0 mg/kg kūno svorio kas 3 dienos, ir tokiu būdu jos naudojimas nelokalizuos (SU-A-904707).

Žinomo gydomojo preparato panaudojimo trūkumas yra tai, kad jis įvedamas į organizmą tik injekcijos būdu, ir taip pat jo panaudojimas, dėl jo sudėtyje esančių imunogenų sukelia šalutinius poveikius (alergiją, sulėtinto veikimo hiperjautrumą ir t.t.).

Panaudojimas gyvulinio audinio, turinčio palyginti didelį kiekį imunodepresantų, kaip žaliavos ir negalėjimas pagaminimo metu pagerinti BAM, kurios pagrindu pagamintas gydomasis preparatas, sudėties, labai žymiai sumažina žinomo BAM ir jo preparato efektyvumą.

Žinomo preparato esminiu trūkumu yra tai, kad pasiekti reikiamam efektui, jo sudėtyje yra didelis kiekis įvairių biologiškai aktyvių medžiagų, kas sąlygoja iš vienos pusės perdozavimo pavojų, šalutinių efektų atsiradimą, ir iš kitos pusės - didina preparato kainą.

Žinomas žmogaus ir gyvūnų fiziologinės būklės normalizavimo būdas, susirgimų iššauktų patalogiškai pasikeitusių ir/arba svetimų ląstelių, mikroorganizmų ir jų gyvybingumo produktų, atveju, numatantis preparato sudaryto iš gyvulinio audinio sudėtinių dalių hidrolizės produktų, įvedimą į organizmą. (SU-A-904707).

Žinomas būdas yra mažai efektyvus dėl aukščiau aprašytų preparato trūkumų ir tame tarpe dėl to, kad jį reikia naudoti didelėmis dozėmis (iki 10 mg/kg) dėl ko gali būti perdozuojamas ir iššaukti šalutinius poveikius.

Aukščiau paminėti trūkumai yra pašalinami pareikštoje biologiškai aktyvioje medžiagoje, turinčioje imunomoduliuojančią savybę, pareikštame šios medžiagos gavimo būde ir šios medžiagos preparate, o taip pat jos panaudojime organizmo fiziologinei būklei normalizuoti.

Išradimo tikslas yra biologiškai aktyvios medžiagos turinčios imunomoduliuojančių savybių, jos gavimo būdas ir šios medžiagos vaistinio preparato jos pagrindu, kurie būtų aukšto biologinio aktyvumo, be toksiško poveikio ir kitų šalutinių efektų, o taip pat galutinio produkto sukūrimas su iš anksto numatytomis savybėmis.

Išradimo tikslas pasiekiamas tuo, kad biologiškai aktyvi medžiaga, turinti imunomoduliuojančių savybių, medžiaga sudaryta iš susmulkinto gyvulinio audinio sudėtinių dalių vandenyje tirpių hidrolizės produktų, išreikštų organiniais junginiais, turinčių savo sudėtyje termostabilių žemomolekulinių morfoplazmos ir glikokalikso ląstelių komponentų, ir modifikuotų embriogenezės ir/arba poliferacijos procesų metu, ir/arba ląstelių diferenciacijos ir/arba patologijos prieš ir/arba lydimos regeneracijos ir audinio reparacijos.

Reikia turėti omenyje, kad terminas "morfoplazma" čia naudojamas plačiąja prasme ir apima struktūrinę citoplazmos ląstelių dalį, pateikiamą ląstelinėmis organelomis, membranomis, citoskeletais ir panašiomis ląstelinėmis struktūromis (Yasuo Karaba. Biomembranos. M. Vysšaja škola - 1995 13-15), o terminas "glikokaliksas" naudojamas žymėti angliavandenių turinčiam sluoksniui, prisišliejusiam prie išorinės plazminės membranos ląstelės (B. Alberts, D. Brei, Jš Liuis. Molekuliarnaja biologija kletki. "Mir" - 1968 m. 97p.).

Tikslas pasiekiamas ir todėl, kad pareikštos BAM modifikuotų morfoplazmos ir glikokalikso ląstelių komponentų sudėtyje yra termostabilūs komponentai (esant temperatūrai $T_M \leq 120^\circ\text{C}$). Be to termostabilių komponentų kiekio santykis su modifikuotais elementais sudaro 30-100% masės.

Be to, žinomos BAM modifikuotų morfoplazmos ir glikokalikso ląstelių komponentų sudėtyje yra žemamolekuliniai komponentai su molekuline mase $M \leq 10,0 \text{ kDa}$.

Be to žemamolekulinių komponentų kiekio santykis su modifikuotais morfoplazmos ir glikokalikso ląstelių komponentais sudaro 30-100% masės.

Išradimo tikslas pasiekiamas ir tuo, kad pareikšta medžiaga hidrolizės produktų su modifikuotais morfoplazmos ir glikokalikso ląstelių komponentais sudėtyje turi organinių junginių, sekančiu masių santykiu, masė (%)

Poliipeptidai -	iki 26,0
Peptidai -	10,0-22,5
Aminorūgštys -	32,0-60,1
Angliavandeniai -	10,5-28,7
Lipidai, nukleotidai ir kiti organiniai junginiai -	2,0-11,0

Be to pareikšta medžiaga turi angliavandenių organinių junginių kiekyje, sekančiu masių santykiu, masė (%)

- stambiamolekulinių junginių, turinčių molekulinę masę $M_{yB} > 10,0$ kDa - iki 2,0

- žemamolekulinių junginių, turinčių molekulinę masę $M_{yn} = 0,8-10,0$ kDa - 2,5-11,5

- laisvų monomerų $M_{ym} < 0,8$ kDa - 6,0-17,0

Tikslas pasiekiamas ir tuo, kad pareikšta medžiaga hidrolizės produktų su modifikuotais morfoplazmos ir glikokalikso ląstelių komponentais sudėtyje turi organinių junginių, sekančiu masių santykiu, masė (%)

Poliipeptidai -	16,3-24,7
Peptidai -	11,9-17,1
Aminorūgštys -	32,0-48,2
Angliavandeniai -	14,6-20,8
Lipidai, nukleotidai ir kiti organiniai junginiai -	5,1-9,3.

Be to, pareikšta medžiaga hidrolizės produktų su modifikuotais morfolazmos ir glikokalikso ląstelių komponentais sudėtyje turi organinių junginių, sekančiu masių santykiu, masė (%)

Poliipeptidai -	5,5-12,7
Peptidai -	13,6-21,0
Aminorūgštys -	37,1-52,9
Angliavandeniai -	16,1-25,1
Lipidai, nukleotidai ir kiti organiniai junginiai -	5,3-11,0

Be to, pareikšta medžiaga hidrolizės produktų su modifikuotais morfolazmos ir glikokalikso ląstelių komponentais sudėtyje turi organinių junginių, sekančiu masės santykiu, masė (%)

Poliipeptidai -	mažiau 0,3
Peptidai -	14,9-22,5
Aminorūgštys -	43,5-60,1
Angliavandeniai -	15,5-28,7
Lipidai, nukleotidai ir kiti organiniai junginiai -	5,0-9,2

Tikslas pasiekiamas ir tuo, kad BAM, turinčios imunomoduliuojančių savybių, gavimo būde, kur atliekamas praplautos žaliavos iš gyvulinio audinio susmulkinimas, gautų ingredientų hidrolizė, po to hidrolizės produktų atskyrimas, jų filtracija ir supernatanto, kaip galutinio produkto išskyrimas, kaip žaliavą naudoja modifikuotą embriogenezės ir/arba poliferacijos procesų metu, ir/arba ląstelių diferenciacijos, ir arba patologijos, prieš ir/arba lydimos regeneracijos ir/arba audinio reparacijos, modifikuotą gyvulinį audinį, ir prieš hidrolizę atlieka jos homogenizaciją ir nesuirusių audinių elementų valymą, išskiriant supernatantą su morfolazmos ir glikokalikso ląstelių komponentais.

Žaliavai naudojami audiniai embrioninis audinys, diferencijuotų timocitų užkrūčio liaukos audinys, sėklidžių spermatogonijos ir spermatocitai, placenta, žarnyno epitelinis audinys, kaulų čiulpų ląstelės, regeneruojantis odos audinys, atsistatantis kepenų audinys, varliagyvių galūnių atsistatantis audinys, patologiškai pakitęs audinys, paimtas iki regeneracijos stadijos.

Be to, po homogenizacijos fiziologiniame ir/arba buferiniame tirpale, atliekamas nesuirusių audinio elementų valymas, filtruojama ir centrifuguojama, greičiu 150-250 g per 10-15 min.

Be to, žaliavos iš gyvulinio audinio susmulkinimas atliekamas prieš homogenizaciją, vykdomas iki ląstelės suirimo, po to ekstrahuojamas papildomai praplaunant ir filtruojama ir/arba centrifuguojama, greičiu 300-15000 g per 10-20 min. ir išskiriama jau ekstrahuota susmulkinta medžiaga.

Tikslas pasiekiamas todėl, kad hidrolizuotų ingredientų sudėtyje morfolazmos ir glikokalikso ląstelių komponentų santykis yra nuo 30-60% nuo bendros organinių junginių masės. Hidrolizę atliekama T_p 4-45°C temperatūroje. Be to, hidrolizė gali būti atliekama ir esant konservantui.

Tikslas pasiekiamas dar ir todėl, kad ingredientų hidrolizės produktus termiškai apdirbama $T_n=60-120^{\circ}\text{C}$ temperatūroje iki pilnos termolabilių junginių denatūracijos ir filtruojama ir/arba centrifuguojama, greičiu 1500 g per 20-40 min., išskiriamas supernatantas, turintis termostabilių galutinio produkto komponentų.

Be to, ingredientų hidrolizės produktus frakcionuoja dializės būdu per pusiau pralaidžią plėvelę ir/arba ultrafiltruoja, ir/arba gelfiltruoja iki išskiriama frakcija, kaip galutinis produktas, turinti žemamolekulinių morfolazmos ir glikokalikso ląstelių komponentų su molekuline mase $M \leq 10 \text{ kDa}$.

Tikslas pasiekiamas ir todėl, kad žinomas preparatas žmonių ir gyvulių organizmo būklei normalizuoti, turintis biologiškai aktyvią medžiagą gyvulinio audinio ingredientų hidrolizės produktų pagrindu, ir užpildą, ta

biologiškai aktyvi medžiaga hidrolizės produktų sudėtyje turi termostabilius, žemamolekulinius morfoplazmos ir gliukokalikso ląstelių komponentus, modifikuotus embriogenezės ir/arba poliferacijos procesų metu, ir/arba ląstelių diferenciacijos, ir/arba patologijos. prieš ir/arba lydimos regeneracijos ir/arba audinio reparacijos, ir jų kiekis preparate sudaro 0,001-85,0 masės (%), o visa kita - užpildas.

Tikslas pasiekiamas ir tuo, kad pareikštas biologiškai aktyvios medžiagos preparatas hidrolizės produktų su modifikuotais morfoplazmos ir gliukokalikso ląstelių komponentais sudėtyje turi organinių junginių, sekančiu masių santykiu, masė (%)

Poliipeptidai -	iki 26,0
Peptidai -	10,0-22,5
Aminorūgštys -	32,0-60,1
Angliavandeniai -	10,5-28,7
Lipidai, nukleotidai ir kiti organiniai junginiai -	2,0-11,0

Be to, tikslas gali būti pasiekiamas ir tuo, kad biologiškai aktyvi medžiaga (vaistas) turi organinių junginių sekančiu santykiu, masė (%)

Poliipeptidai -	16,3-24,7
Peptidai -	11,9-17,1
Aminorūgštys -	32,0-48,2
Angliavandeniai -	14,6-20,8
Lipidai, nukleotidai ir kiti organiniai junginiai -	5,1-9,3

Tikslas pasiekiamas tuo, kad biologiškai aktyvi medžiaga (vaistas) turi organinių junginių sekančiu masių santykiu:

Poliipeptidai -	5,5-12,7
Peptidai -	13,6-21,0
Aminorūgštys -	37,1-52,9

Angliavandeniai -	16,1-25,1
Lipidai, nukleotidai ir kiti organiniai junginiai -	5,3-11,0

Pareikštame preparate gali būti biologiškai aktyvi medžiaga, turinti savo sudėtyje, masės %

Polipeptidai -	mažiau 0,3
Peptidai -	14,9-22,5
Aminorūgštys -	43,5-60,1
Angliavandeniai -	15,5-28,7
Lipidai, nukleotidai ir kiti organiniai junginiai -	5,0-9,2

Preparato užpildu gali būti natrio chlorido fiziologinis tirpalas ir/arba druskos buferio tirpalas, ir/arba angliavandeniniai junginiai, ir/arba mineralinės, gyvulinės, augalinės ir sintetinės kilmės riebalai, ir jų mišiniai.

Papildomai preparatas gali turėti konservantą.

Tikslas pasiekiamas ir tuo, kad žmogaus ir gyvulių susirgimų, susijusių su patologiniais pakitimais ir/arba svetimų prigimties ląstelėmis mikroorganizmais ir/arba gyvybingumo palaikymo produktais, fiziologinei būklei normalizuoti naudojamas gyvulinės medžiagos ingredientų hidrolizės produktų preparatas, ir tas preparatas yra biologiškai aktyvios medžiagos, turinčios hidrolizės produktų sudėtyje modifikuotus audinius, paveiktus embriogenezės ir/arba poliferacijos procesuose, ir/arba ląstelių diferencijacijos, ir/arba patologijos paveiktos prieš ir/arba lydimos regeneracijos, ir/arba audinio reparacijos, morfoplazmos ir glikokalikso ląstelių komponentus, kompozicija, 0,001-85,0 masės (%) ir užpildas, 15,0-99,999 masės (%). Preparatas naudojamas injekcijomis į raumenis 0,005-0,5 mg/kg svorio, intervalu 1-7 dienas, ir/arba naudojamas inhaliacijoms 0,012-0,12 mg/kg kas 4-48 valandas, ir/arba sublingvaliai 0,012-0,12 mg/kg kas 4-48 valandas, ir/arba geriamas 0,02-1,0 mg/kg kas 1-10 dienų, ir/arba interaliai piliulėmis 0,02-1,0 mg/kg kas 1-10 dienų, ir/arba intranazaliai - paros dozė 0,001-0,05 mg/kg kas 2-24 valandos,

ir/arba kompresais, žvakės, tepalai dedami ant pūlinio ar žaizdos kas 1-10 dienų, - iki fiziologinės būklės parametrų normalizacijos.

Be to, žmonių ir gyvulių fiziologinė būklė normalizuojama stimuliuojant imuninę sistemą, visų pirma aktyvinant retikuloendotelinę sistemą, T-, B-sistemas, neutrofilus ir/arba natūralių kilių populiaciją.

Nustatyta, kad pareikštos BAM gautos nurodytu būdu praktiškas efektyvumas pasireiškia aukštu biologiniu aktyvumu, ir visų pirma padidintu imunomoduliuojančiu efektu.

Aktyvinant imuninę sistemą, ir visų pirma makrofagų granulocitų eilės ląsteles, pareikšta BAM ir jos preparatas:

1) veikia ne į konkrečią patologiją, o mobilizuodami vidinius rezervus, normalizuojančius visus homeostazės parametrus, tame tarpe ir patologiją, gerina bendrą organizmo fiziologinę būklę. Be to, koreguoja patologijų sukeltus nukrypimus nuo normos be šalutinio poveikio. Pareikšta BAM, skirtingai nuo kitų vaistinių preparatų, normalizuodama pakitusius parametrus, nekenkia kitiems organizmo homeostazės parametrams.

2) turi kompleksinę veikimą, kuris leidžia išplėsti BAM panaudojimo sritis eilei susirgimų, kuriuos kontroliuoja imuninė sistema, gydyti

3) turi tokį veikimo aktyvumo laipsnį, nukreiptą homeostazės, kuri koreliuoja nukrypimus nuo normos, parametrų normalizacijai.

Nurodyti rezultatai pasiekiami dėl ypatingų pareikštos BAM ir jo preparato savybių.

Nustatyta, kad modifikuotų morfoplazmos ir glikokalikso ląstelių komponentų kiekis padidinamas, panaudojant gyvulinį audinį, paveiktą embriogenezės ir/arba proliferacijos procesuose, ir/arba diferenciacijos, ir/arba patologijos, prieš ir/arba lydimos regeneracijos ir/arba audinio reparacijos.

Tokie audiniai yra:

- diferencijuoti užkrūčio liaukos timocitai
- sėklidžių spermatogonijos ir spermatocitai, kaulų čiulpų ląstelės, žarnyno epitelinis audinys
- embirioninis audinys, placenta

- varliagyvių galūnių atsistatantis audinys, regeneruotas kepenų audinys, po dalinės hepatektomijos arba po apsinuodijimo, pavyzdžiui CCl_4 , regeneruotas odos audinys, o taip pat audinys paveiktas patologijos, pavyzdžiui, paveiktas gangrenos, chemiškai arba termiškai apdorotas.

Paminėtų audinių, kaip žaliavos panaudojimas, suteikia BAM laukiamas savybes.

Ši modifikuotų morfoplazmos ir glikokalikso ląstelių komponentų savybė įgalina juos panaudoti pareikštos BAM ir preparato jos pagrindu gamyboje.

Preparatą įvedus į žmogaus ar gyvulio organizmą stimuliuojama atsakomoji organizmo reakcija į patologiją.

Pagrindinę rolę šiame procese vaidina imuninė sistema.

Materialiais informacijos nešikliais aukščiau išvardintuose procesuose ir/arba nurodytų audinių nukrypimuose nuo normos yra specialūs komponentai, kurie įeina į morfoplazmos ir glikokalikso ląstelių struktūrą, ir keičiantis ląstelių fiziologiniam statusui pasiduoda modifikacijai. Pareikšta BAM ir jos preparatas turi modifikuotus morfoplazmos ir glikokalikso ląstelių komponentus, dėl ko juos naudojant stimuliuojama atsakomoji organizmo reakcija.

Prieš hidrolizę atliekamas susmulkinto audinio nuplovimas nuo audinio ekstrakto komponentų ir kraujo, ir kartu vykdoma homogenizacija, po kurios pašalina nesuardytus audinio elementus, suteikia pareikštos BAM ir jo preparato morfoplazmos ir glikokalikso ląstelėms aukštą koncentraciją (30-60%), o taip pat sumažina imunodepresantų, neutralių ir balastinių junginių kiekį. Tai padidina organizmo imuninį atsakymą.

Organizmo atsakomoji reakcija padidėja, įvedant į organizmą medžiagą, kuri savo sudėtyje turi termostabilius morfoplazmos ir glikokalikso ląstelių žemamolekulinius su molekuline mase $M \leq 10$ kDa komponentus (stabilius $T_M \leq 120^\circ \text{C}$ kaitinimo temperatūroje).

Pareikšta BAM naudojama kaip veiklusis pagrindas preparate, o užpildai naudojami priklausomai nuo panaudojimo.

Vidiniam panaudojimui preparatas naudojamas injekcijomis, o užpildas - fiziologinis natrio chlorido tirpalas arba buferinis druskos tirpalas.

Išviršiniam panaudojimui, be aukščiau išvardintų tirpalų, užpildui naudojami geliai - augaliniai ar gyvuliniai angliavandenių junginiai, pavyzdžiui, medus, sultys, augalų minkštimas ir panašiai, ir/arba tepalai - gyvulinės, augalinės arba sintetinės kilmės riebalai, arba jų mišiniai.

Preparato efektyvumas labai priklauso nuo BAM sudėties. Dėl to galima pasiekti reikiamą efektyvumą žymiai sumažinus preparato veikliojo pagrindo kiekį, dėl ko išvengiama perdozavimo ir šalutinio poveikio, sumažėja preparato kaina.

Be to, pastebėta, kad aukščiau aprašytos preparato savybės leidžia panaudoti jį fiziologinei organizmo būklei normalizuoti, įvedant į organizmą bet kokias dozes, o būtent nuo 0,001 iki kelių g/kg svorio.

Nurodytos savybės iliustruojamos konkrečiuose išradimo panaudojimo pavyzdžiuose: 1,2,4,8,9,12,16,18-25 ir kt.

Susirgimai, sukeliama patologinių pakitimų ir/arba svetimų ląstelių, mikroorganizmų ir/arba jų veiklos produktų, gydomi nauju preparatu, konkrečiomis dozėmis ir konkrečiais būdais iliustruoti konkrečiuose išradimo panaudojimo pavyzdžiuose: 3,4,7,8,11-13,15-17 ir kt.

Biologiškai aktyvi medžiaga, turinti imunomoduliuojančių savybių, gaunama sekančiu būdu.

Žaliavai naudojamas gyvulinis, embriogenezės ir/arba proliferacijos procesų metu, ir/arba ląstelių diferencijacijos ir/arba patologijos metu prieš ir/arba kartu su audinio regeneracija ir/arba reparizacija, modifikuotas audinys.

Gyvulinis audinys plaunamas, smulkinamas, po to homogenizuojamas fiziologiniame ir/arba buferiniame tirpale iki visiško ląstelių suirimo, o homogenizuotas mišinys išvalomas nuo nesuirusių medžiagos elementų filtravimo ir/arba centrifugavimo metu, išskiriant morfolazmos ir glikokalikso ląstelių turinčius ingredientus, o po to hidrolizuojamas. Hidrolizės produktai po centrifugavimo ir/arba filtracijos naudojami kaip galutinis produktas, organizmo fiziologinei būklei normalizuoti.

Galutinio produkto efektyvumas priklauso nuo modifikuotų morfolazmos ir glikokalikso ląstelių komponentų kiekio jame. Kiekis padidinamas,

optimaliai pasirenkant žaliavą su intensyviais modifikacijos procesais audinyje, ir optimalaus jo gavimo būdo.

Žaliava parenkama remiantis ta aplinkybe, kad morfoplazmos ir glikokalikso ląstelių komponentai reaguodami į fiziologinės būklės ląstelių pakitimus, pakeičia savo struktūrą, ir tas pakitimas iššaukia audinio imuninį pakitimą, o tuo pačiu ir organizmo atsakomąsias imunines reakcijas. Nustatyta, kad modifikuotos struktūros imunogeniškumas išlaikomas visų stadijų procesuose (embriogenezė ir pan.).

Gyvuliniu audiniu naudojamas

- prieškrūčio liaukos diferencijuoti timocitai (ląstelių diferenciacijos procesas)
- sėklidžių spermatogonijos ir spermatocitai, kaulų čiulpų ląstelės, epitelinis žarnyno audinys (ląstelių proliferacijos ir diferenciacijos procesai)
- embrioninis audinys, placenta (proliferacijos, diferenciacijos, embriogenezės procesai)
- varliagyvių galūnių atsistatantis audinys, regeneruotos žiurkių kepenys po dalinės hepatektomijos arba po apsinuodijimo, pavyzdžiui, CCl_4 , regeneruotas odos audinys, o taip pat audinys paveiktas patologijos, pavyzdžiui, paveiktas gangrenos, chemiškai arba termiškai apdorotas (įvairių procesų kombinacija).

Aprašytų gyvulinių audinių kaip žaliavos pareikštame būde panaudojimas įgalina gauti biologiškai aktyvią medžiagą su laukiamomis savybėmis.

Nustatyta, kad charakteringiausia aukščiau aprašytų įvairių audinių savybė yra jų morfoplazmos ir glikokalikso ląstelių struktūrinių komponentų pakitimas, leidžiantis išdiferencijuoti nuo intaktinių arba ramybės organizmo audinio ląstelių.

Ši modifikuotų morfoplazmos ir glikokalikso ląstelių komponentų savybė nurodytuose audiniuose, leidžia juos panaudoti pareikštoje BAM, kurią įvedus į organizmą suteikiama galimybė stimuliuoti atsakomąją organizmo reakciją į patologiją. Pagrindinę rolę vaidina organizmo imuninė sistema.

Geriausia panaudoti gyvulinį audinį, paimtą modifikacijos proceso inkremento stadijoje. Ši stadija nustatoma empiriškai pagal imuninio pakitimo charakterį. Embrioninio audinio panaudojimo atveju šis periodas atitinka pirmąją embriogenezės pusę. Regeneruotas žiurkių kepenis po dalinės hepatektomijos naudoja po 4-12 valandų, o regeneruotų galūnių panaudojimo atveju - blastemos susidarymo stadijoje.

Santykinis morfoplazmos ir glikokalikso ląstelių komponentų kiekio padidėjimas pasiekiamas pagrindine sąlyga, t.y. nesuirusių audinio elementų pašalinimu.

Nesuirusių elementų valymas atliekamas centrifūgavimo procese, greičiu 150-250 g per 10-15 min. Esant didesniai centrifūgavimo greičiui ir ilgesniai laikui nusodinami morfoplazmos ir glikokalikso ląstelių elementai, o esant lėtesniai negu 150 g per 10-15 min. - valymas neefektyvus.

Nesuirusių elementų valymas atliekamas filtravimo procese stambiaporiniu filtru, pavyzdžiui, per kelis marlės sluoksnius, per medvilninį audinį arba kaproninį tinklą.

Imunomoduliuojanti savybė galutiniame produkte sustiprinama tuo, kad prieš homogenizaciją, audinys susmulkinamas iki ląstelių pažeidimo, po to ekstrahuojamas papildomai praplaunant fiziologiniu tirpalu ir/arba filtruojamas organinės rūgšties tirpalu, ir/arba centrifūguojamas, greičiu 300-15000 g per 10-20 min. ir gautas ekstraguotas susmulkintas audinys homogenizuojamas.

Be to, iš vienos pusės, pašalinama daugiau imunodepresantų, esančių kraujo serume ir audinio ekstrakto, o iš kitos pusės - santykinai padidinamas morfoplazmos ir glikokalikso ląstelių kiekis.

Papildomas susmulkinto gyvulinio audinio prieš homogenizaciją praplovimas centrifūguojant, greičiu 300-15000 g per 10-20 min., įgalina kokybiškiau atskirti ekstraguotą audinį iš ekstrakto pramoninėmis sąlygomis.

Analogiškas efektas pasiekiamas filtruojant stambiaporiniu filtru, pavyzdžiui, per kelis marlės sluoksnius, per medvilninį audinį arba per kaproninį filtrą.

Santykinį morfoplazmos ir glikokalikso ląstelių komponentų audinio ingredientuose, išskirtuose hidrolizės pravedimui, nustato pagal baltymų ir angliavandenių ląstelių struktūrose, išlaisvintose nuo nesuirusio audinio, kieki.

Galutinio produkto efektyvumas žymia dalimi padidėja, naudojant žemamolekulinius morfoplazmos ir glikokalikso ląstelių komponentus.

Iš vienos pusės tai padeda išvengti nepageidaujamų reiškinių, o iš kitos pusės - gauti plataus veikimo profilio preparatą. Tuo tikslu audinio ingredientai, turintys modifikuotą morfoplazmos ir glikokalikso ląstelių, hidrolizuojami suardant morfoplazmos ir glikokalikso ląstelių stambiamolekulines struktūras į komponentus, turinčius mažesnę molekulinę masę. Hidrolizės produktų efektyvumas priklauso nuo hidrolizės specifikos, kuri priklauso nuo temperatūros - laiko charakteristikų.

Nustatyta, kad imunomoduliuojanti savybė, būtent dalinai žiurkių peritonealinio eksudato makrofagų aktyvumas (in vitro) maksimaliai padidėja, kada hidrolizės pravedimo temperatūra $T=4-45^{\circ}\text{C}$.

Nukrypimai nuo temperatūros nepageidaujami todėl, kad

- esant temperatūrai $T_p < 4^{\circ}\text{C}$ žymiai pailgėja hidrolizės procesas, tai mažina ekonominį efektyvumą
- esant temperatūrai $T_p > 45^{\circ}\text{C}$ sumažėja fermentų, katalizuojančių žaliavos hidrolizę, aktyvumas, ir pagreitinėja aktyvių komponentų suirimo procesas.

Dėl to pablogėja galutinio produkto kokybė.

Hidrolizės trukmė nustatoma pagal psiekiamą maksimalų imunomoduliuojantį efektą, iš dalies, pagal peritonealinio eskudato makrofagų aktyvumą, sutinkamai su NST-testu.

Ilga hidrolizė atliekama kartu su konservantu.

Santykinis hidrolizės produktuose žemamolekulinių komponentų kiekio padidėjimas atitinkamai stambiamolekulinių termolabilių junginių kiekiui pasiekiamas hidrolizato termišku apdirbimu iki pilnos termolabilių junginių denatūracijos, po to liekana pašalinama, centrifuguojant, greičiu

1500 g per 20-40 min. ir/arba filtracija. Supernatantas, turintis termostabilių morfoplazmos ir glikokalikso ląstelių komponentų panaudojimas kaip galutinis produktas.

Hidrolizės produktai termiškai apdirbami $T_H \geq 60-120$ °C temperatūrų diapazone.

Esant $T_H < 60$ °C temperatūrai ne visi baltymai denatūruojami, dėl ko galutiniame produkte padidėja termolabilių junginių. Dėl to sumažėja medžiagos specifinis aktyvumas. Esant $T_H > 120$ °C temperatūrai, galutinio produkto peptidų ir angliavandenių komponentuose šuoliškai didėja struktūrinių pakitimų greitis, dėl ko blogėja produkto kokybė.

Po terminio apdorojimo, termostabilius komponentus pašalina centrifūguojant, greičiu ne mažesniu 1500 g per 20-40 min. Esant mažesniai centrifūgavimo laikui, sumažėja denatūruotų termolabilių junginių pašalinimo lygis. Centrifūgavimo laikas 20-40 min. yra optimaliausias.

Koaguluotus denatūruotus termostabilius junginius galima atskirti nuo supernatanto, filtruojant per popierinį filtrą.

Galutinis produktas, turintis termostabilius morfoplazmos ir glikokalikso ląstelių komponentus, pasižymi dideliu specifiniu aktyvumu. Jis gali būti naudojamas ir kaip priemonė injekcijoms tiek veterinarijoje, tiek ir medicinoje.

Tolimesnis BAM specifinio aktyvumo padidinimas pasiekiamas žemamolekulinių komponentų su molekuline mase $M \leq 10,0$ kDa. Iš hidrolizės produktų dializės per pusiau persisunkiančią plėvelę ir/arba ultrafiltracijos, ir/arba gelfiltracijos būdu visiškai pašalinami stambiamolekuliniai junginiai, galintys sukelti šalutinius efektus.

Tokiu būdu pasiekiamas efektyvumas leidžia galutinį produktą naudoti medicinoje.

Pareikštą BAM, kaip veiklų pagrindą naudoja vaistinio preparato gamybai, kur preparato koncentracija priklauso nuo panaudojimo tikslo. Preparatuose, skirtuose gyvulių girdymui ir šėrimui, BAM koncentracija neaukšta, o preparatuose skirtuose injekcijoms, taip pat tepalams, geliams ir milteliams - didesnė.

Užpildai naudojami priklausomai nuo paskirties. Preparatuose skirtuose injekcijoms, inhaliacijoms, aplikacijoms ir intranazaliai naudojami natrio chlorido ir druskos buferinis tirpalai. Angliavandeniai junginiai užpildu naudojami preparatuose, skirtuose bičių maitinimui (pvz., 10% cukraus tirpalas) arba gelio paruošimui (pvz., medus, sultys ir augalų minkštimas). Tepalams užpildu naudojami mineralinės, gyvulinės, augalinės ir sintetinės kilmės riebalai arba jų mišiniai.

Žemiau aprašyti konkretūs pareikštų išradimų grupės gavimo ir panaudojimo pavyzdžiai, taip pat pateikti biologiškai aktyvių medžiagų kiekio ir savybių nustatymo metodai.

1 pavyzdys

Pareikštos BAM gavimui buvo panaudotas embrioninis audinys, paimtas iš karvės pirmoje nėštumo pusėje.

Iš embriono, po jo dezinfekcijos silpname kalio permanganato tirpale (KMnO_4) išpjaunamas raumeninis ir odos audinys, kepenys, blužnis, kasa, inkstai, plaučiai ir širdis, ir stambiai sumalama su mėsmale.

10 kg gauto faršo sumaišoma su 30 kg fiziologinio tirpalo ir homogenizuojama su peiliniais blenderiais iki vientisos masės. Mišinio valymui nuo nesuardytų audinio elementų panaudojama dekantacija, o gautas viršnuosėdinis skystis su audinio ingredientais, turinčiais morfoplazmos ir glikokalikso ląstelių komponentais, autolizuojamas ($T_H=45^\circ\text{C}$ temperatūroje, 48 valandų bėgyje). Gautas hidrolizatas, filtruojamas per popierinį filtrą, o filtratas, turintis morfoplazmos ir glikokalikso ląstelių komponentų, panaudojamas kaip galutinis produktas, kurio organinių junginių sudėtis ir specifinis aktyvumas parodyti 1 ir 2 lentelėse.

Galutinis produktas, kur BAM sudaro 1,0 % nuo bendro svorio, o kita dalis - užpildas, sumaišomas su 9 dalimis agurkų-kriaušių minkštimo ir naudojamas kaip gydomasis preparatas - gelio kaukė ant veido kosmetikos reikmėms.

Ilgam laikymui į gelį pridedama konservantų (nipaginas ir nipazolas masių santykiu 5:1) su galutine masės koncentracija 0,1 mas. %. Gelis dedamas ant veido 2-3 val. Procedūra pakartojama 1-2 kartus per savaitę. Gydomasis efektas pasiekiamas po 4-10 seansų ir stebimas pagal odos būklę.

2 pavyzdys

Embriogeninis audinys, gautas taip pat kaip 1 pavyzdyje, susmulkinamas. 10 kg gauto faršo sumaišoma su 30 kg fiziologinio skysčio ir homogenizuojama iki vientisos masės.

Kad pašalinti nesuirusius audinio elementus, homogenizuota medžiaga centrifuguojama, greičiu 250 g per 10 min. Po centrifugavimo liekanos pašalinamos, o flotiruoti riebalai pašalinami, supernatantą filtruojant per medvilninę medžiagą (drobę). Į filtruotą homogenatą, turintį ingredientų su morfolazmos ir glikokalikso ląstelių komponentais 30% masės, pridedama konservanto (chinozolo) iki galutinės koncentracijos 0,08 % masės. Po sumaišymo, homogenatas 6 savaites hidrolizuojamas $T_p = 4^\circ\text{C}$ temperatūroje.

Gautas hidrolizatas centrifuguojamas, greičiu 15000 g per 20 min. ir išskiriamas supernatantas su morfolazmos ir glikokalikso ląstelių komponentais, jau kaip galutinis produktas, kurio organinių junginių sudėtis ir jų specifinis aktyvumas parodyti lentelėje 1 ir 2.

Gautas galutinis produktas, turintis BAM 1,0% masės, o likusi dalis - užpildas, naudojamas kaip vaistinis preparatas nusilpusių kailinių žvėrelių jauniklių išsaugojimui, o taip pat viščiukų inhaliavimui specialioje kameroje, kur jie laikomi 15-20 min. Kameroje preparatas išpurškiamas - 0,5 ml ant 1 m² per 1 min. Procedūra kartojama 7 savaites. Efektas kontroliuojamas jauniklių kritimo skaičiaus sumažėjimu. Jauniklių kritimas aumažėja 30-40%.

3 pavyzdys

Embrioninis audinys, gautas kaip ir 1 pavyzdyje, susmulkinamas. Gautas faršas užliejamas dvigubu kiekiu fiziologinio skysčio ir sumaišomas. Gauta masė centrifuguojama, greičiu 1500 g per 20 min. Nuosėdos pašalinamos ir vėl sumaišoma su dvigubu kiekiu fiziologinio skysčio, ir vėl taip pat centrifuguojama. Faršo plovimo operacija atliekama 3 kartus. Po to 10 kg išplauto faršo sumaišoma su 30 kg centimoliariniu fosfatinu druskiniu buferiniu tirpalu (0,01 M PBS) pH 7,2, turinčiu dukart pakeisto natrio fosfato centimoliarinį kiekį ir penkiolika centimolių natrio chlorido (0,01 M Na_2HPO_4 ir 0,15 M NaCl), ir homogenizuojama koloidiniu malūnu iki vientisos masės. Nesuirusius audinio elementus nuosėdų pavidalu pašalina centrifuguojant, greičiu 150 g per 15 min.

Supernatantas, po flotiruojančių riebalų pašalinimo filtravimo būdu, apdorojamas konservantu iki galutinės koncentracijos 0,08% masės.

Sumaišytas homogenizatas, turintis 60% masės morfoplazmos ir glikokalikso ląstelių komponentų, hidrolizuojamas 6 savaites temperatūroje $T_p = 4^\circ\text{C}$. Gautas hidrolizatas centrifuguojamas, greičiu 1500 g per 40 min. iki išsiskirs supernatantas, turintis morfoplazmos ir glikokalikso ląstelių komponentų, jau kaip galutinis produktas, kurio organinių junginių sudėtis ir jų specifinis aktyvumas parodyti 1 ir 2 lentelėse.

Galutinis produktas, turintis BAM 1,0 % masės kiekio, o likusi dalis - užpildas, panaudojamas kaip gydomasis preparatas veršeliams, sergantiems paragripu, gydyti injekcijomis atliekamomis į raumenis 0,05 ml/kg masės kas trečią dieną. Gydomo efektas pasireiškia po 1-5 injekcijų. Jis kontroliuojamas pagal temperatūrą ir virusų kiekį kraujyje.

4 pavyzdys

Stambiai mėsmale sumaltas faršas, gautas kaip ir 1 pavyzdyje, užpilamas 2-kart didesniu kiekiu 3% acto rūgšties ir sumaišomas. Mišinys vakuume filtruojamas per medvilninę medžiagą - siurbiamuoju filtru. Nuosėdos pašalinamos, vėl sumaišoma su dvigubu kiekiu fiziologinio tirpalo ir

centrifuguojama, greičiu 300 g per 20 min. 10 kg plauto faršo sumaišoma su 30 kg centimoliarinio fosfatinio druskinio buferinio tirpalo (0,01 M PBS) pH 7.2. turinčio centimoliarinį dukart pakeisto natrio fosfato ir 15 centimoliarinį natrio chlorido kiekį (0,01 M Na_2HPO_4 ir 0,15 M NaCl), ir homogenizuota masė filtruojama per medvilninę medžiagą (drobelę). Gautas filtratas papildomas konservantu 0,08 % masės. Sumaišytas homogenatas, turintis 50,0% masės morfoplazmos ir glikokalikso ląstelių komponentų hidrolizuojamas $T_p=20^\circ\text{C}$ temperatūroje 8 dienas. Toliau apdorojama kaip pavyzdyje 3.

Galutinio produkto organinių junginių sudėtis ir jo specifinio aktyvumo rodikliai parodyti 1 ir 2 lentelėse. Galutinis produktas, turintis BAM 1,0 masės % kiekio, o visa kita - užpildas, naudojamas dermatozėms gydyti.

Tepalo pavidalo preparatas, paruošiamas sumaišius lanoliną, vazeliną ir galutinį produktą BAM santykiu 1:3:1 masės dalių. Oda tepama tepalu kiekvieną dieną. Gydomasis efektas pasireiškė po 4-12 dienų ir kontroliuojamas pagal odos stovį.

5 pavyzdys

Santykinis morfoplazmos ir glikokalikso ląstelių komponentų kiekio procentais (pagal masę) su jungiamojo audinio komponentais ir audinio ingredientų ekstraktu, išskirtais hidrolizės pravedimui, nustatomas pagal išlaisvintose nuo nesuirusio audinio dalelių ląstelinėse struktūrose esančio baltymų ir angliavandenių kiekį.

Tuo tikslu išvalytas nuo nesuirusių audinio elementų kaip ir 1-4 pavyzdžiuose, homogenatas ultracentrifuguojamas, greičiu 100000 g per 60 min.

Baltymų kiekio visoje liekanoje santykis su kiekiu visame supernatante parodo baltymų morfoplazmos ir glikokalikso ląstelių komponentų santykį su ekstrakto baltymais.

Baltymų kiekis liekanoje ir supernatante nustatomas po homogenato ultracentrifugavimo. Po supernatanto pašalinimo į 0,1 ml liekanos pridedama 4,9 ml fiziologinio tirpalo ir po suspendavimo, paimama 0,1 ml

baltymų kiekiui nustatyti, fotometriškai, pagal tirpalo spalvos intensyvumą SDS-Louri metodu. (U.K. Laemmli. - Nature, - 1970, - V 227, - 5259 - p. 680-685).

Baltymų kiekiui supernatante nustatyti į 0,1 ml supernatanto pridedama 0,9 ml fiziologinio tirpalo ir po sumaišymo paimama 0,1 ml baltymų kiekiui nustatyti. pagal SDS-Louri.

Jungiamojo audinio komponentų kiekis nustatomas aminorūgščių analizės metodu pagal oksiliziną ir oksiproliną.

Skirtingai nuo žinomos BAM, aminorūgščių nerasta.

Glikokalikso ląstelių komponentų kiekis nustatomas pagal angliavandenių įeinančių į junginį su molekuline mase daugiau 0,8 kDa homogenate kiekį reakcija su antronu po glikogeno granulių pašalinimo iš homogenato (S.Seifter, S.Dayton, C.Honiv - Arh. Biochemistry and Biophysical, - 1950, - 25, - 1, - p. 191-200).

Tuo tikslu 20 ml audinio homogenatas sluoksniuojamas centrifugos vamzdeliuose 30 ml ant 5 ml sacharozės ($d=1,40$ tankumu) ir ultracentrifuguojamas, greičiu 100000 g per 60 min. Glikogenas, nusėdęs vamzdelių dugne, pašalinamas, o morfoplazmos ir glikokalikso ląstelių elementai atrenkami interfazėje ir, po plovimo nuo sacharozės, centrifuguojant fiziologiniame tirpale, ir naudojami tyrimams.

Angliavandenių kiekis tiriamuose pavyzdžiuose nustatomas pagal bendrą angliavandenių kiekį po hidrolizės ir laisvų angliavandenių - monomerų kiekį. Pagal šių duomenų skirtumą matavimuose nustatomas laisvų angliavandenių kiekis įvairių junginių sudėtyje.

Bendrai hidrolizei praversti imama 1,0 ml tiriamo pavyzdžio ir sumaišoma su 1 ml 4,0 N druskos tirpalu. Hidrolizuojama 105 °C temperatūroje 2 valandas, po to hidrolizatas vakuume garinamas eksikatoriuje su NaOH. Išgarintas bandinys atskleidžiamas 1,0 ml distiliuoto vandens ir naudojamas tyrimams.

Laisvų angliavandenių kiekio, esančių BAM arba po rūgštinės hidrolizės nustatomos tokiu būdu:

1 ml bandinio sumaišomas su 1 ml distiliuoto vandens, po to maišant pastovioje -5°C temperatūroje, pridedama 4 ml 0,2% antrono reaktyvo, paruošto su 95 % sieros rūgšties (H_2SO_4). Gautas mišinys kaitinamas

95°C temperatūroje 10 min., ir atšaldžius nustatomas optinis tankis ties 620 nm bangos ilgiu. Standartu imamas 20 $\mu\text{g/ml}$ gliukozės koncentrato. Gautos 1 ir 2 pavyzdžiuose BAM baltymų analizė - morfoplazmos ir glikokalikso ląstelių komponentų - $37,6\pm 7,4\%$, o BAM gautos 3 ir 4 pavyzdžiuose - $51,8\pm 8,2\%$.

Čia ir toliau tekste, o taip pat lentelėse eksperimentiškai gauti dydžiai išreikšti vidurkiu su vidurkio nukrypimo ribomis, išskaičiuotais pagal Stjudento kriterijų.

6 pavyzdys

Hidrolizės supernatantas, gautas 3 pavyzdyje, kaitinamas $T_{H1}=55^{\circ}\text{C}$, $T_{H2}=60^{\circ}\text{C}$, $T_{H3}=95^{\circ}\text{C}$, $T_{H4}=120^{\circ}\text{C}$ ir $T_{H5}=135^{\circ}\text{C}$ temperatūroje kaitinama iki pilnos hidrolizės produktų termolabilių junginių denatūracijos, po to centrifuguojama, greičiu 1500 g per 30 min. iki išsiskiria supernatantas, kaip galutinis produktas, turintis termolabilių morfoplazmos ir glikokalikso ląstelių.

Gautas galutinis produktas, kiekvienu atveju turi imunomoduliuojantį efektą, kurio reikšmės parodytos 3 lentelėje.

Šioje lentelėje parodytas BAM specifinio aktyvumo reikšmių pasiskirstymas, priklausomai nuo pasirinkto hidrolizato kaitinimo temperatūros diapazono ir už jo ribų. Optimali kaitinimo temperatūra yra $T_H=95^{\circ}\text{C}$, kada gautas galutinis produktas turi maksimalų fermentinį ir fagocitarinį aktyvumą, 72,8% ir 64,3%.

$T_H=55^{\circ}\text{C}$ temperatūroje specifinio aktyvumo dydis palyginus su kontroliniu vidutiniškai sudaro 61,1% pagal NST testą ir 52,3% - pagal fagocitus. $T_H>120^{\circ}\text{C}$ temperatūroje vyksta šuoliškas peptidų ir turinčių angliavandenių junginių struktūrinis kitimas, dėl ko kinta galutinio produkto komponentų struktūrinis kitimas, o to pasekoje sumažėja BAM specifinis aktyvumas. $T_H=135^{\circ}\text{C}$ temperatūroje specifinis BAM

aktyvumas palyginus su kontroliniu vidutiniškai lygus 57,3%, pagal NST testą ir 43,0% - pagal fagocitus. Maksimalus BAM specifinis aktyvumas palyginus su kontroliniu pasiekiamas $T_H=60-120$ °C temperatūroje, kurioje žiurkių peritonealinio eskudato makrofagų aktyvumas (*in vitro*) sudaro 72,8% - pagal fermentinį aktyvumą (NST testas), o pagal fagocitinį aktyvumą (*E.Coli*) - 64,3%.

7 pavyzdys

Hidrolizės supernatantas, gautas 3 pavyzdyje, kaitinamas $T_H=95$ °C temperatūroje iki visiškos termolabilių elementų denatūracijos ir po atšaldymo centrifuguojamas, greičiu 1500 g per 40 min.

Denatūruotų junginių liekana pašalinama, o kaip galutinis produktas naudojamas supernatantas, kuris turi 60% masės termostabilių komponentų pagal peptidus atitinkamai hidrolizės produktams vandenyje tirpių junginių iki termoapdirbimo.

Organinių junginių kiekis hidrolizės produktuose ir gautos medžiagos aktyvumo rodikliai, gauti eksperimentiškai, parodyti 1 ir 2 lentelėse.

Galutinis produktas, turintis BAM 0,5% masės kiekio, o kita dalis užpildas, naudojamas karvių mastitams gydyti injekcijomis į raumenis 0,05 ml/kg svorio kas trečią dieną. Gydomo efektas stebimas po 1-4 injekcijų ir kontroliuojamas pagal tešmenį ir pūlingas išskyras.

8 pavyzdys

Hidrolizato supernatantas, gautas 2 pavyzdyje, termiškai apdirbamas iki pilnos termolabilių junginių denatūracijos ir po atšalfymo centrifuguojamas, greičiu 50000 g per 20 min. Nuosėdos pašalinamos, o kaip galutinis produktas naudojamas supernatantas, kuris turi 30% masės termo stabilių komponentų pagal peptidus atitinkamai hidrolizės produktams vandenyje tirpių junginių iki terminio apdirbimo. Organinių

junginių kiekis hidrolizės produktuose ir medžiagos specifinio aktyvumo rodikliai, gauti eksperimentiškai, nurodyti 1 ir 2 lentelėse.

Gautas galutinis produktas, turintis 0,5% BAM masės kiekio, o kita dalis - užpildas, naudojamas kaip gydomasis preparatas veršelių, sergančių paragripu gydymui injekcijomis į raumenis 0,05 ml/kg du kartus kas 14 dienų. Preparato panaudojimo efektyvumas registruojamas pagal susirgusių galvijų skaičių per mėnesį neviršijo 10%, o kontrolinis siekė net 22-28%.

9 pavyzdys

Hidrolizatas, gautas 4 pavyzdyje, termiškai apdirbamas $T_H=95$ °C temperatūroje iki visiškos termolabilių junginių denatūracijos ir po atšaldymo filtruojamas siurbiamuoju filtru per filtruojamą popierių. Filtratas, turintis 45% pagal peptidus termostabilių elementų atitinkamai hidrolizės produktams vandenyje tirpių junginių, naudojamas kaip galutinis produktas.

Organinių junginių kiekis hidrolizės produktuose ir medžiagos specifinio aktyvumo rodikliai, gauti eksperimentiškai, parodyti 1 ir 2 lentelėse.

Galutinis produktas, liofiliai išdžiovinamas ir sublingvaliai naudojamas kaip gydomasis preparatas moterų mastitams gydyti. Procedūra atliekama kiekvieną dieną. Gydymo efektas stebimas po 1-4 dienų ir kontroliuojamas pagal krūties stovį (sukietėjimus, pūlingas išskyras) ir kraujo tyrimus.

10 pavyzdys

Supernatanto hidrolizatas, gautas 3 pavyzdyje, frakcionuojamas ultrafiltravimo įrenginyje "Anicon". Naudojami ultrafiltrai praleidžiantys junginius su molekuline mase mažesne arba lygia: 50,0 kDa, 10,0 kDa, 5,0 kDa, 1,0 kDa, 0,8 kDa, 0,5 kDa.

Gautų fraksių, turinčių junginių su molekuline mase: 1) $M_1 > 50,0$ kDa, 2) $10,0 \text{ kDa} < M_2 < 50,0$ kDa, 3) $M_3 < 10,0$ kDa, 4) $M_4 < 5,0$ kDa, 5) $M_5 < 1,0$

kDa, 6) $M_6 < 0,8$ kDa, 7) $M_7 < 0,5$ kDa biologinis aktyvumas analizuojamas pagal sugebėjimą aktyvinti žiurkių peritonealinio eksudato makrofagus pagal NST-testą. Tyrimų rezultatai parodyti 4 lentelėje.

Išvados padarytos pagal 4 lentelės analizę:

- 1) specifinio aktyvumo pagal frakcijas pasiskirstymas turi išreikštą maksimumą, masių diapazone nuo 0,8 iki 10,0 kDa
- 2) specifinio aktyvumo sumažėjimas, esant molekulinei masei $M > 10,0$ kDa susijęs su inhibitorių veikimu galutiniame produkte ir aktyvios substancijos koncentracijos sumažėjimu;
- 3) specifinio aktyvumo sumažėjimas, esant molekulinei masei $M < 0,8$ kDa susijęs su aktyvios substancijos, oligomerinių junginių pavidale, $M > 0,8$ kDa, koncentracijos sumažėjimu.

11 pavyzdys

Supernatanto hidrolizatas, gautas 3 pavyzdyje, sufiltruojamas miliporinio filtro BPY-15-PA (TY6-12-151-87) aparatu AP-2,0.

Gautas ultrafiltratas, turintis žemamolekulinius morfoplazmos ir glikokalikso ląstelių komponentus $M \leq 10,0$ kDa, naudojamas kaip galutinis produktas, kur žemamolekuliniai komponentai su $M \leq 10,0$ kDa sudaro 60% masės pagal peptidus atitinkamai hidrolizės produktams vandenyje tirpių junginių po ultrafiltracijos.

Organinių junginių hidrolizės produktuose kiekis ir gautaos medžiagos specifinio aktyvumo rodikliai parodyti 1 ir 2 lentelėse.

Galutinis produktas, turintis BAM 0,1% masės kiekio, o kita dalis užpildas, naudojamas kaip vaistinis preparatas eksperimentams žiurkių hepatitui gydyti injekcijomis į raumenis 0,05 ml/kg kas antrą dieną (gydymas ir rezultatai aprašyti 34 ir 35 pavyzdžiuose).

12 pavyzdys

Hidrolizato supernatantas, gautas 2 pavyzdyje, dializuojamas 16-24 val. per celofaninę plėvelę, fiziologiniu tirpalu, kurio 1 kg turi 0,8 g konservanto. Gautas dializatas naudojamas kaip galutinis produktas, kur žemamolekuliniai komponentai, kur $M \leq 10$ kDa, sudaro 30% masės pagal peptidus atitinkamai produktams vandenyje tirpių junginių prieš dializę.

Organinių junginių hidrolizės produktuose kiekis ir gautos medžiagos specifinio aktyvumo rodikliai parodyti 1 ir 2 lentelėse.

Galutinis produktas, turintis BAM 0,1% masės kiekio, o kita dalis - užpildas naudojamas kaip gydomasis preparatas injekcijomis veršelių homeostazės parametrams normalizuoti. Veršeliams, su nukrypimais nuo normos leidžiamos injekcijos į raumenis 0,05 ml/kg 1-2 mėnesius. Efektas kontroliuojamas veršelių svėrimu kas mėnesį. Paros prieauglis padidėja 47-70% palyginus su kontroliniu.

13 pavyzdys

Hidrolizato supernatantas, gautas 7 pavyzdyje, gelfiltruojamas sefadekso G-25 $d=26$ mm diametro ir $h=600$ mm aukščio kolonėlėje, su decimoliariniu (0,01 M) fosfatinu buferiniu tirpalu pH 7,2, turinčiu penkiolika centimolių natrio chlorido (0,15 M NaCl).

Hidrolizato supernatanto frakcionavimas pagal molekulinę masę atliekamas kolonėlės eliuacija tuo pačiu buferiniu tirpalu, ir eliuato chromatografinis profilis kontroliuojamas spektrometriškai, esant bangos ilgiui 280 nm.

Hidrolizato žemamolekulinių komponentų frakcija, turinti morfoplazmos ir glikokalikso ląstelių komponentų, eliuuojama kaip galutinis produktas.

Organinių junginių hidrolizės produktuose kiekis ir gautos BAM specifinio aktyvumo rodiklis, gauti eksperimentiškai, parodyti 1 ir 2 lentelėse.

Galutinis produktas, turintis BAM 0,1% masės kiekio, o kita dalis - užpildas, naudojamas kaip vaistinis preparatas veršelių, sergančių bronchopneumonija arba aštriu respiratoriniu susirgimu. Preparatas injekcijomis leidžiamas į raumenis 0,05 ml/kg kas trečią dieną.

Gydymo efektas stebimas po 1-7 injekcijų, ir kontroliuojamas pagal kūno temperatūrą.

14 pavyzdys

Pareikštos BAM efektyvumo priklausomybė nuo modifikuotų morfoplazmos ir glikokalikso ląstelių komponentų kiekio nustatoma žaliavos iš gyvulinio audinio, kuriuose vykdo embriogenezės ir/arba proliferacijos procesuose, ir/arba ląstelių diferenciacijos, ir/arba patologijos, prieš ir/arba lydimos audinių regeneracijos ir/arba reparacijos, panaudojimu.

Gautos medžiagos apdirbamos taip pat, kaip pavyzdyje 7. Galutinio produkto, gauto panaudojant kiekvienu iš paminėtų modifikuotų ląstelių struktūrų audinį, o būtent morfoplazmos ir glikokalikso ląstelių, parodyti 5 lentelėje.

5 lentelės analizė parodo, kad imunomoduliuojančio efekto buvimas BAM ir jo stiprumas priklauso nuo panaudojamos žaliavos, iš kurios gauti hidrolizės produktai, turintys modifikuotus morfoplazmos ir glikokalikso ląstelių komponentus.

Žaliavai iš gyvulinio audinio paimto ląstelių poliferacijos ir diferenciacijos stadijoje, naudojamus žiurkių sėklidžių spermatogonijos ir spermatocitai, kaulų čiulpų ląstelės, žiurkių žarnyno epitelinis audinys. Žaliavai iš gyvulinio audinio, paimto su embriogenezės procesais, naudojamas žiurkių embrioninis audinys.

Žaliavai su patologijos ir prieš įvykusios regeneracijos procesais, naudojamas žiurkių kepenys po dalinės hepatektomijos, o žaliavai su patologijos procesais lydimais regeneracijos - regeneruotas varliagyvių galūnių audinys, žiurkių kepenys po anglies tetrachlorido (CCl_4) poodinio įvedimo.

Kartu su gautais tyrimų duomenimis, 5 lentelėje parodyti imunomoduliuojančio efekto, gauto panaudojant žiurkių patelių raumenų ir kepenų intaktinį audinį, duomenys.

5 lentelės analizė parodo, kad imunomoduliuojantis efektas pareikštos BAM, gautos panaudojant audinius, paveiktus embriogenezės, proliferacijos procesuose, ir patologijos, prieš ir/arba lydimos regeneracijos ir/arba audinio reparacijos, aukštesnis negu panaudojant audinius nepaveiktus nurodytų procesų.

Be to, galima padaryti išvadą, kad didžiausias imunomoduliuojantis efektas pasiekiamas, panaudojant atsistatantį kepenų audinį, embrioninį audinį ir varliagyvių galūnių atsistatantį audinį.

15 pavyzdys

Žaliavai naudojamos žiurkių regeneruotos kepenys po 4-12 valandų po hepatektomijos, atliktas žinomu metodu (G.M. Higgins, R.M. Anderson Experimental pathology of the liver. - Arch. Pathology, - 1931- N 12- p.186).

Kepenys smulkiai nupjaustomos ir sumaišomos su trim kiekiais fiziologinio tiepalo, po to centrifuguojama, greičiu 1500 g per min., o gauta liekana sumaišoma su trim kiekiais fiziologinio tirpalo ir vėl centrifuguojama tose pačiose sąlygose. Susmulkinto audinio plovimas atliekamas 3 kartus, o tolimesnės galutinio produkto gavimo stadijos atliekamos taip pat kaip ir 3, 7 ir 11 pavyzdžiuose.

Gautų galutinio produktų specifinis aktyvumas nustatomas eksperimentiškai pagal žiurkių kepenų, paveiktų CCl_4 , hepatocitų reparacinių savybių aktyvumą, kur Na, K - AT Fazės aktyvumas atstatomas, atitinkamai $32,7 \pm 3,1\%$; $43,6 \pm 3,9\%$ ir $85,4 \pm 7,8\%$ palyginus su gyvulių grupe, kuriai pareikšta medžiaga nebuvo naudota.

Aminotransferazių kraujyje aktyvumas atstatomas $37,4 \pm 2,8\%$; $47,2 \pm 3,4\%$ ir $98,3 \pm 1,7\%$, - o kepenų hepatocitų kalio koncentracija - $22,6 \pm 1,8\%$; $28,9 \pm 2,5\%$ ir $58,1 \pm 4,7\%$.

Galutinis produktas, turintis BAM 0,1% maės kiekio, o likusi dalis - užpildas, naudojamas kaip gydomasis preparatas, veršelių sergančių

hepatitu gydymui injekcijomis į raumenis 0,05 ml/kg kiekvieną 3 dieną. Gydomo efektas stebimas po 7-14 injekcijų ir kontroliuojamas pagal aminotransferazės aktyvumą, bilirubino ir azoto koncentraciją kraujyje.

16 pavyzdys

Žaliavai naudojamos bulių sėklidžių išspaudos, gautos po lidazių išskyrimo, ekstrahuojant 3% acto rūgštimi audinio homogenatą.

Gautos sėklidžių išspaudos, lidazės gamybos liekana pakartotinai homogenizuojama trim dalim fiziologinio tirpalo peiliniuose homogenizatoriuose ir centrifuguojama, greičiu 250 g per 15 min., kad pasišalintų nesuirę audinio elementai.

Natrio šarmo decinormaliniu vandens tirpalu (0,1 N NaOH) terpės rūgštingumas padidinamas iki pH 7,4 ir į homogenatą, turintį morfoplazmos ir glikokalikso ląstelių komponentų, modifikuotų ląstelių diferenciacijos ir poliferacijos procesuose pridedama konservanto 0,8 g/l, po to sumaišoma ir hidrolizuojama su tolimesniu apdirbimu, kaip ir 3,7 ir 11 pavyzdžiuose.

Gautų galutinių produktų specifinis aktyvumas nustatomas eksperimentiškai, pagal žiurkių peritonealinio eksudato makrofagų ir kraujo neutrofilų aktyvumą. Naudojant galutinį produktą, gautą kaip 11 pavyzdyje, fermentinis makrofagų aktyvumas padidėjo $108,3 \pm 13,2\%$, o fagocitarinis, pagal E.Coli aktyvumas - $92,2 \pm 10,2\%$. Kraujo neutrofilams šie rodikliai atitinkamai padidėjo $99,2 \pm 14,1\%$ ir $72,4 \pm 8,3\%$.

Galutinis produktas, turintis BAM 0,1% masės kiekio, o likusi dalis - užpildas, sumaišomas su 50 kiekių vandens ir naudojamas, kaip maistinis preparatas, vištų homeostazės parametrams normalizuoti. Vištos girdomos 5 ml/kg 2-6 savaites.

Efekto kontrolė stebima kiaušinių stiprumo padidėjimu 15-30%, palyginus su kontroline grupe.

17 pavyzdys

Žaliavai naudojama karvių placenta, kuri apdirbama taip pat, kaip ir 3, 7 ir 11 pavyzdžiuose., ir gaunami galutiniai produktai, kurių specifinis aktyvumas nustatomas eksperimentiškai pagal žiurkių peritonealinio ekskudato makrofagų ir kraujo neutrofilų aktyvumą.

Pagal 11 pavyzdį gautą galutinio produkto fermentinis makrofagų aktyvumas padidėja $150,6 \pm 17,4\%$, o fagocitarinis makrofagų aktyvumas padidėja $109,3 \pm 12,7\%$.

Kraujo neutrofilų atitinkami rodikliai sudaro $137,6 \pm 16,8\%$ ir $95,7 \pm 11,3\%$.

Galutinis produktas, turintis BAM 0,5% masės kiekio, o likusi dalis - užpildas, naudojamas karvėms, sergančioms endometritu gydyti. Injekcijos į raumenis daromos kas 3 dieną po 0,05 ml/kg. Gydomo efektas stebimas po 6-10 injekcijų ir kontroliuojamas pagal uždegimines reakcijas, histologiniu tyrimu ir pūlingų išskyrų rodiklius.

18 pavyzdys

Žaliavai naudojama užkrūčio liaukos išspaudos, gautos po netirpių audinio komponentų, kurie yra timozino gamybos atliekos, išskyrimo iš homogenato.

Užkrūčio liaukos išspaudos apdirbamos taip pat, kaip ir 3, 7 ir 11 pavyzdžiuose ir gaunami galutiniai produktai, kurių specifinis aktyvumas nustatomas eksperimentiškai pagal T-limfocitų blastransformacijos reakcijos stimuliaciją ir kuri padidėja $165,6 \pm 13,7\%$, palyginus su kontroline, kur naudojamas galutinis produktas gautas pagal 11 pavyzdį.

Galutinis produktas, turintis BAM 0,5% masės kiekio, o kita dalis - užpildas, naudojamas intranazaliai, kaip vaistinis preparatas žmogaus infekcinių susirgimų profilaktikai. Į kiekvieną nosiaryklę įlašinama po 2 lašus ir masažuojama kad šie nutekėtų į gleivinę. Tokia procedūra atliekama 2 kartus per dieną. Efektas kontroliuojamas pagal organizmo būklę ir kūno temperatūrą.

19 pavyzdys

Gydomasis preparatas, turintis BAM, gautas taip pat, kaip ir 1-4, 7-9, 11-13 ir 15-17 pavyzdžiuose, su 0,001% BAM masės jame. Užpildas - 10% sacharozės tirpalas.

Preparatas naudojamas bitėms maitinti.

Vienos bičių šeimos vienam maitinimui skirtas 1l preparato, palyginus su kontroliniu, pagerino:

- išgyvenimą 85-140%
- išskridimų skaičių 100-160%
- medaus rinkimo 27-64%

20 pavyzdys

Gydomasis preparatas, turintis BAM, gautas taip pat, kaip 1-4, 7-9, 11-13 ir 15-17 pavyzdžiuose, paruošiamas su 85% masės kiekio liofiliškai išdžiovinto BAM. Užpildu naudojamas antiseptikas. Preparatas pabarstų pavidalu paruoštas iš liofiliškai išdžiovintų miltelių naudojamas atvirų žaizdų, nudegimų, traumų, gleivinės erozijai gydyti.

Preparato naudojimas pagreitina regeneracinius procesus 2-7 kartus, palyginus su kontroliniu.

21 pavyzdys

Gydomasis preparatas, turintis BAM, gautas taip pat, kaip 1-6, 9-14, 16-21 ir 23-25 pavyzdžiuose, paruošiamas su 1,0% BAM masės.

Užpildu naudojamas gelis ir augalų minkštimo: agurkų, obuolių, persikų piure. Preparatas naudojamas kosmetikoje. Gydomasis efektas stebimas po 4-8 seansų ir kontroliuojamas pagal odos elastingumą.

22 pavyzdys

Gydomasis preparatas, turintis BAM, gautas taip pat, kaip 1-6, 9-14, 16-21 ir 23-26, pavyzdžiuose, paruošiamas su 1,0% BAM masės.

Užpildu naudojamas gelis - 15 dalių medaus, 3 dalys ropinio svogūno sulčių, 1 dalis česnako sulčių ir 1 dalis varnalėšų aliejaus.

Preparatas naudojamas plaukų šaknims stiprinti. Gelis uždedamas ant galvos 2-8 valandoms. Procedūra atliekama 1 kartą per savaitę. Gydomo efektas stebimas po 5-12 seansų ir kontroliuojamas pagal plaukų stovį.

23 pavyzdys

Gydomasis preparatas, turintis BAM, gautas taip pat, kaip 1-6, 9-14, 16-21 ir 23-2, pavyzdžiuose, paruošiamas su 1,0% BAM masės.

Užpildu naudojamas lanolino mišinys su spermacetu 1:3. Preparatas naudojamas odos sluoksnio atstatymui po dermatozės. Preparato panaudojimas 2-5 kartus pagreitino atstatymo procesus, palyginus su kontroliniu.

24 pavyzdys

Gydomasis preparatas, turintis BAM, gautas taip pat, kaip 1-6, 9-14, 16-21 ir 23-26, pavyzdžiuose, paruošiamas su 1,0% BAM masės.

Užpildu naudojama kakava. Preparatas naudojamas endometritų gydymui žvakutėmis. Gydomo efektas stebimas po 14-21 dienos, ir kontroliuojamas pagal uždegiminės reakcijos, histologinių tyrimų, kraujo analizės rodiklius.

25 pavyzdys

Gydomasis preparatas, turintis BAM, gautas taip pat, kaip 1-6, 9-14, 16-21 ir 23-26 pavyzdžiuose, paruošiamas su 1,0% BAM masės.

Užpildu naudojamas lanolino ir vazelino mišinys 1:3. Preparatas naudojamas gleivinės erozijai gydyti. Atstatomieji procesai vyksta 3-5 kartus greičiau, negu kontrolinio.

26 pavyzdys

BAM, gautos taip pat, kaip ir 1-18 pavyzdžiuose, aminorūgščių analizė atliekama trim kryptimis, kuriomis nustatoma:

- bendra aminorūgščių sudėtis;
- peptidų ir laisvų aminorūgščių, be rūgštyje netirpių baltymų, aminorūgščių sudėtis;
- laisvų aminorūgščių sudėtis.

1) BAM, gautos taip pat, kaip 1-18 pavyzdžiuose, bendra aminorūgščių analizė atliekama hidrolizės būdu vakuume 6-normalinėje druskos rūgštyje (6 N HCl) 110 °C temperatūroje 24 valandas.

Po hidrolizės, bandinys garinamas vakuume virš sauso natrio šarmo (NaOH). Sausa liekana atskiedžiama 0,2 N natrio-citrato buferiniu tirpalu pH 2,2 ir analizuojama aminorūgščių analizatoriaus jonų mainų kolonėlėje.

2) Rūgštyje netirpiems baltymams pašalinti į 0,5 ml bandinio pridedama 0,5 ml 3% sulfosalicilinės rūgšties, palaikoma 1 val., periodiškai pamaišant. Denatūruoti baltymai pašalinami centrifugavimu, greičiu 8000 g per 15-20 min. Gautam supernatantui, atliekama bendra aminorūgščių analizė.

3) BAM, gautos taip pat, kaip 1-18 pavyzdžiuose, laisvų aminorūgščių kiekis nustatomas po bandinių sulyginimo 0,2 N natrio-citrato buferiniu

tirpalu pH 2,2 ir po filtracijos per popierinį nukalkintą filtrą, užnešus ant aminorūgščių analizatoriaus jonų mainų kolonėlės.

Aminorūgščių kolonėlės eliuacija pravedama natrio-citratinio buferiniu tirpalu pH 3,25; pH 4,25 ir pH 5,28. Frakcionuotos aminorūgštys apdirbamos ninhidridiniu reaktyvu ir nustatomas optinis tankis pratekamu fotometru ties 440 ir 570 nm bangos ilgiu.

27 pavyzdys

BAM, gautas taip pat, kaip 1-18 pavyzdžiuose, bendras lipidų kiekis nustatomas tokiu būdu. 0,5 ml BAM sumaišoma su 1,5 ml koncentruotos sieros rūgšties (H_2SO_4) ir kaitinama $95^{\circ}C$ temperatūroje 15 min. Į ataušintą 0,1 ml hidrolizatą pridedama 1,5 ml fosfovanilinio reaktyvo (firmos Chempal.) pagal žinomą bendrą lipidų nustatymo metodą pagal specifinį nudažymą. (J.M. Knight, S. Anderson, J.M. Rawle. - Clinical Chemistry - 1972, 18, p. 199). Optinis tirpalo tankis nustatomas ties 530 nm bangos ilgiu.

28 pavyzdys

BAM, gautos taip pat, kaip 1-8 pavyzdžiuose, nukleotidų analizė atliekama tokiu būdu. Purininiai ir pirimidininiai rūgštyje tirpūs nukleotidai ekstrahuojami iš 1,5-5,5 ml 5% atšaldytos chloro perrūgšties ($HClO_4$) bandinio. Bandiniai po 20 min. ekstrakcijos, šaltyje centrifuguojami, greičiu 2500 g per 10 min., liekana tris kartus plaunama 5% chloro perrūgštimi, supernatantai sujungiami ir panaudojami rūgštyje tirpių nukleotidų išskyrimui. Rūgštyje tirpi frakcija hidrolizuojama vienamoliarine chloro perrūgštimi (1 M $HClO_4$) $100^{\circ}C$ temperatūroje 1 val. iki pirimidininių monofosfatų ir purinų. Tirpalai neutralizuojami kalio šarmu (KOH) ir hidrolizės produktai paskirstomi katijonų mainininke "DAUEKS" 50x4 laiptine eliuacija:

distiliatu (H_2O) - šlapimo rūgščiai ir uridinmonofosfatui (UMF); 0,2 M chloro perrūgštimi - ksantino ir citozino monofosfatui; 0,4 M chloro perrūgštimi - hipoksantinui;

1,0 M chloro perrūgštimi - guaninui; 2 M chloro perrūgštimi - adeninui.

Nukleotidai identifikuojami chromatografiškai pagal judėjimą katijonų mainininke lyginant su standartu, o taip pat pagal absorbcijos spektrus ties 200-300 nm. Nukleotidų kiekis nustatomas, panaudojant moliarinės ekstincijos koeficiento dydį.

29 pavyzdys

BAM, gautos taip pat, kaip 1-18 pavyzdžiuose, imunomoduliuojantis aktyvumas nustatomas pagal wister linijos žiurkių peritonealinių makrofagų aktyvumą bandymais in vitro, pagal fermentinio tetrazolio aktyvumo stiprumą nitro-mėlio redukcijoje iki diformazano (NST - testas) ir pagal fagocitarinio aktyvumo stiprumą E. Coli atžvilgiu.

Į dekapituotų gyvūnų pilvo ertmę švirkštu įvedama 20 ml Chenkso tirpalo, turinčio heparino 20 vnt./ml. Po 2-3 min. pilvo masažo, padaroma įpjova ir tuo pačiu metu švirkštu iš ertmės ištraukiamas įvestas skystis, kuris filtruojamas per neiloninį filtrą ir centrifuguojamas, greičiu 150-200 g per 15 min. Gauta liekana suspenduojama 0,5 kiekio šviežiu Chenkso tirpalu ir vėl centrifuguojama tokiomis pačiomis sąlygomis. Išskirtų ląstelių plovimas atliekamas 3-4 kartus, po ko ląstelių koncentracija suspensijoje gaunama 80×10^6 ląstelių/ml. Visų ląstelių audinio eskudate makrofagų kiekis sudaro 25-35%.

Žiurkių peritonealinio eksudato makrofagų fermentinis aktyvumas nustatomas spektrometriškai pagal nitro tetrazolio mėlio redukciją iki diformazano. Žiurkių peritonealinio eksudato ląstelių liekana atskiedžiama bespalviu Chenkso tirpalu iki 80×10^6 ląstelių/ml koncentracijos. Į 5 μ l ląstelių suspensijos pridedama bandinio su pH 7,4 ir 1,0 mg/ml peptidų koncentracija. Mišinys inkubuojamas vandens vonioje pastoviai papurtant 37 °C temperatūroje 30 min., po to pridedama 5 μ l prisotinto 20 °C temperatūroje nitro tetrazolio mėlio "Reanal" firmos ir dar inkubuojama 30

min. Po to pridedama 3 ml acetono ir centrifuguojama, greičiu 2000 g per 20 min. Nusodinta acetoninė ištrauka fotometruojama ties 515 nm bangos ilgiu.

Fermentinio aktyvumo palyginimo kontrolei naudojamas bandinys su konservantu fiziologiniame tirpale.

Žiurkių peritonealinio eksudato ląstelių fagocitarinis aktyvumas nustatomas pagal jų sugebėjimą užimti E.Coli.

Į 50 µl ląstelių suspensijos pridedama 50 µl bandinio su pH 7,4 ir peptidų koncentracija 0,05 mg/ml. Mišinys inkubuojamas 37 °C temperatūroje vandens vonioje 30 min. pastoviai pakratant. Po inkubacijos mišinys suspenduojamas 10 ml bespalviu Chenkso tirpalu 4 °C temperatūroje ir centrifuguojamas, greičiu 150-200 g per 15 min. Žiurkių peritonealinio eksudato ląstelių liekana atskiedžiama Chenkso tirpalu iki $2,5 \times 10^6$ ląstelių/ml koncentracijos. 0,2 ml gautos suspensijos uždedama ant 18x18 mm stiklo ir inkubuojama 37 °C temperatūroje 30 min. 5% anglirūgšties (CO₂) atmosferoje, kad makrofagai prisitvirtintų prie stiklo. Po inkubacijos prie stiklo neprisiklijavusios ląstelės pašalinamos 3 kart paskalaujant stiklinėje su Chenkso tirpalu. Į likusias ant stiklo ląsteles pridedama 0,2 ml E.Coli suspensijos 20×10^6 ląstelių/ml koncentracijos ir inkubuojama tose pat sąlygose 45 min. Po to stiklas vėl 3 kartus stiklinėje paskalaujamas, fiksuojamas metanoliu ir nudažomas Romanovskio-Grimzos metodu.

Fagocitozės indeksas (FI) nustatomas pagal formulę:

$$FI = (O + 2,5n + 6t + 9p + 10R) / \text{ląstelių skaičius, (1)},$$

kur O - skaičius ląstelių, nefagocituotų pagal E.Coli,

n - ląstelių skaičius, prarijusią 1-4 ląsteles,

t - ląstelių skaičius, prarijusią 5-7 ląsteles,

p - ląstelių skaičius, prarijusią 8-9 ląsteles,

R - ląstelių skaičius, prarijusią 10 ir daugiau E.Coli ląstelių.

Makrofagų identifikacija atliekama pagal nespecifinės esterazės spalvą.

30 pavyzdys

BAM, gautas taip pat kaip 1-18 pavyzdžiuose, imunomoduliuojantis aktyvumas nustatomas pagal wistar linijos žiurkių kraujo neutrofilų aktyvumą bandymuose in vitro, pagal fermentinį aktyvumą pagal nitro tetrazolio mėlio redukcijos iki diformazano (NST - testas) atstatymo ir pagal fagocitarinį aktyvumą E. Coli atžvilgiu.

Žiurkių uodegos arterijos kraujas surenkamas į mėgintuvėlius su bespalviu Chenkso-heparino tirpalu ir maišomas. Į gautą mišinį pridedama 6% dekstrano T-500 santykiu 3:1 ir mėgintuvėliai 1 val. statomi į šaldytuvą.

Nusėdus eritrocitams, viršnuosėdinis leukocitų sluoksnis paimamas pipete ir centrifuguojamas, greičiu 250 g per 15 min. Eritrocitai iš leukocitų masės pašalinami hemolizavimu - leukocitų liekana suspenduojama distiliuotame vandenyje, pridedama Chenkso tirpalo ir centrifuguojama. Leukocitų liekana dar suspenduojama šviežiu Chenkso tirpalu ir centrifuguojama tokiose pat sąlygose. Leukocitai plaunami 3 kartus.

Kraujo neutrofilų fermentinis aktyvumas nustatomas spektrofotometriškai pagal nitro tetrazolio mėlio redukciją iki difomazano.

Žiurkių kraujo eritrocitų liekana atskiedžiama bespalviu Chenkso tirpalu iki 80×10^6 ląstelių/ml koncentracijos. Į 100 mkl ląstelinės suspensijos pridedame 300 ml. BAM, gautos pagal 1-2 pavyzdžius, kurios pH - 7,4 ir peptidų koncentracija - iki 1,0 mg/ml. Mišinys inkubuojamas 30 min. 37 °C temperatūroje vandens vonioje pastoviai sukrečiant, po to pridedama 400 µl tirpalo firmos Reanal nitro tetrazolio mėlio ir tolimesnės operacijos atliekamos kaip 29 pavyzdyje.

Žiurkių kraujo fagocitarinis aktyvumas nustatomas pagal jų sugebėjimą užimti E.Coli.

Į 5 µl leukocitų suspensijos pridedama 50 µl BAM, pH 7,4, peptidų koncentracija 0,05 mg/ml. Mišinys inkubuojamas, po to pridedama 10 ml bespalvio Chenkso tirpalo 4 °C temperatūroje ir centrifuguojama, greičiu 150-200 g per 15 min. Leukocitų liekana atskiedžiama 0,3 ml Chenkso tirpale ir pridedama 0,05 ml E.Coli suspensijos 500×10^6 ląstelių/ml

koncentracijos, po to inkubuojama 30 min. 37 °C temperatūroje. Po inkubacijos daromi tepinėliai, kuriuose po nudažymo fagocituojančių ląstelių skaičius ir fagocitozės indeksas nustatomas pagal 29 pavyzdį.

31 pavyzdys

BAM, gautos taip pat kaip 1-18 pavyzdžiuose, imunomoduliuojantis aktyvumas nustatomas bandymais in vivo linijos BALB/C pelėse.

Gyvūnams daromos dvi poodinės perperato injekcijos dviejų dienų intervalu po 0,5 ml/kg, esant peptidų koncentracijai 1,0 mg/ml. Imunomoduliuojančių savybių analizė atliekama praėjus dviem parom po paskutinės injekcijos. Kiekvienam bandymui naudojama ne mažiau 10 gyvūnų. Kontrolei naudojami gyvūnai, apdoroti pagal nurodytą schemą 0,08% konservantu, ištirpintu fiziologiniame tirpale.

Limfocitų blastransformacijos reakcijai nustatyti, T-ląstelių mitogenu naudojamas fitohemagliutinas, B ląstelių mitogenu lipopolisacharidas E.Coli. Limfocitai, išskirti iš pelių gemalo, inkubuojami su duotais mitogenais 72 val. 37 °C temperatūroje 5% anglirūgšties atmosferoje. Ląstelių proliferacijos lygis nustatomas radiometriškai, pagal įjungtą ³H-timidiną. Dėl to, į kultūras pridedama ³H-timidino (3,7x10⁴ Bk/bandiniui) ir inkubuojama 3 val. Po to bandiniai dedami ant miliporinių filtrų, triskart plaunami 199 terpe, po to 5% trichloracto rūgšties tirpalu ir etanolium. Filtrai išdžiovinami, dedami į flakonus su scintiliaciniu tirpalu ir skaitikliu "Mark 111" nustatomas bandinių radioaktyvumas.

32 pavyzdys

BAM, gautos taip pat, kaip 1-18 pavyzdžiuose, imunomoduliuojantis efektyvumas nustatomas pelių bandymais ir vivo pagal splenocitų natūralaus kilerių aktyvumo stimuliavimą. Gyvūnams dvi dienas daroma po 2 poodines preparato injekcijas 0,05 ml/kg, peptidų koncentracija 1,0 mg/ml.

Imunomoduliuojančių savybių analizė atliekama praėjus parai po injekcijos. Kiekvienam bandymui naudojama ne mažiau 10 gyvūnų. Kontrolei naudojami gyvūnai, apdirbti pagal nurodytą schemą 0,08 % konservantu, atskiestu fiziologiniame tirpale. Splenocitų natūralus kilerinis aktyvumas nustatomas pelių limfomos ląstelėse, pažymėtose chromo izotopu ^{51}Cr . Inkubacija vykdoma 18 valandų esant ląstelių taikinių ir ląstelių efektorių santykiui 1:25 ($1 \times 10^5 : 2,5 \times 10^6$ ląstelių).

Specifinis chromo izotopo išlaisvinimas, atitinkantis efektorinių ląstelių citotoksiniam aktyvumui, skaičiuojamas pagal formulę:

$$^{51}\text{Cr} = \frac{[(\text{išlaisvinta eksperimentiškai}) - (\text{pastovus išlaisvinimas})]}{(\text{maksimalus išlaisvinimas}) - (\text{pastovus išlaisvinimas})} \times 100 \quad (2)$$

kur maksimalus išlaisvinimas yra radioaktyvumas, kada visos ląstelės lizuoja. Kontroliniam natūraliam kilerių aktyvumui nustatyti naudojamas konservantas, ištirpintas fiziologiniame tirpale.

33 pavyzdys

BAM, gautos taip pat, kaip ir 1-18 pavyzdžiuose, imunomoduliuojantis aktyvumas nustatomas pagal pelių užkrūčio liaukos funkcinį aktyvumą bandymuose in vivo, sąlygose analogiškose 31 pavyzdžiui.

Veikimo efektas nustatomas pagal užkrūčio liaukos serumo faktoriaus (LSF) titrą.

Bandomųjų pelių kraujo serumas ultrafiltruojamas sistemoje CENTRIFLOCF - 50A. Reakcijoje naudojamas 0,1 ml kondensuotas ir skiestas 199 terpėje serumas. Kontroliuojama 199 terpėje.

Pelių gemalas paimamas praėjus 10-14 dienų po timektotirovavimo. Iš serumo paimamos ląstelės preparavimo adatomis išpluoštinius audinių terpėje 199. Filtruojama per kaproninį tinklą po to 2 kart plaunama terpėje 199, centrifuguojant aplinkoje iki 4×10^7 ląstelių/ml koncentracijos, ir

gauta 0,1 ml suspensija pridedama į mėgintuvėlius su serumu ir 199 terpe. Mėgintuvėlių turinys sumaišomas ir inkubuojamas 37 °C temperatūroje 60 min.

Po inkubacijos, į visus mėgintuvėlius pridedama po 0,1 ml antitimocitinio serumo ir jūrų kiaulyčių komplemento atskiesto 1:10. Suspensija dar inkubuojama 37 °C temperatūroje 30 min. Po to į mišinį pridedama po 0,1 ml avino eritrocitų suspensijos (12×10^7 ląstelių/ml) sumaišoma, centrifuguojama, greičiu 250 g per 5 min. ir inkubuojama 60 min. 4-8 °C temperatūroje. Liekana mėgintuvėliuose suspenduojama 5 min. Lizdai skaičiuojami Gorajavo kameroje. Lizdu laikomas limfocitas, prisijungęs 4 ir daugiau eritrocitus.

Titru USF laikomas paskutinis serumo praskiedimas, iššaukiantis 50% ląstelių lizdų sudarymo redukciją (LSR) palyginus su kontroliniu. Rezultatai atsispindi titro su 2 pagrindu logaritme, t.y. $\log A$, kur A titro reikšmė.

34 pavyzdys

BAM, gautos taip pat kaip ir 1-18 pavyzdžiuose, žiurkių kepenų hepatocitų reparacijos stiprėjimo efektyvumas po poodinio įvedimo CCl_4 nustatomas pagal Na, K - ATF-azės aktyvumo atstatymą tokiu būdu.

Žiurkių patinams 230-250 g svorio kiekvieną dieną 4 dienas po oda įleidžiama CCl_4 mišinyje su augaliniu aliejumi 1:1, 4,0 ml/kg. Praėjus 4 val. po pirmos CCl_4 injekcijos, bandomiems gyvūnams atliekama pirma iš 4 medžiagos poodinių injekcijų vienos dienos intervale po 0,05 ml/kg. Medžiagos efektyvumas registruojamas sekančią dieną po paskutinės injekcijos.

Na K-ATF-azės aktyvumas nustatomas, panaudojant hepatocitų ląstelinių membranų frakcijas. 15 g atšaldytų 3 žiurkių kepenų homogenizuojama 150 g 1 m M $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ tirpale, pH 7,5 su 0,5 mM CaCl_2 tirpalu, naudojant stiklinį homogenizatorių.

Homogenizuotas mišinys centrifuguojamas, greičiu 150 g 4 °C temperatūroje 10-12 min. Supernatantas pakartotinai centrifuguojamas

greičiu 100000 g per 20 min., gauta liekana plaunama 3 kartus 130 ml buferyje tokiom pat centrifugavimo sąlygomis.

Po plovimo liekana resuspenduojama buferiniame tirpale, iki baltymo koncentracijos, SDS - Louri metodu, 3,0 mg/ml ir naudojama tyrimams.

Visos membranos frakcijos gavimo operacijos atliekamos šaltyje.

Na, K-ATF-azės hepatocitų membranos plazminis aktyvumas nustatomas standartinėje terpėje iš 66 mM NaCl, 34 mM KCl, 5 mM $MgCl_2$, į kurią prieš bandymus pridedama 5 mM ATF.

Į 1,8 ml nurodytos terpės, pridedama 0,2 ml membranos frakcijos suspensijos su baltymų 3,0 mg/ml koncentracija ir inkubuojama 37 °C temperatūroje 15 min., po to reakcija sustabdoma, pridedama 0,6 ml 5% trichloracto rūgšties tirpalo. Mišinys centrifuguojamas, greičiu 300-500 g per 15 min. Į 1,0 ml gauto supernatanto pridedama 4 ml 0,2 M acetato buferinio tirpalo pH=4,0 0,5 ml 1% amonio T molibdato tirpalo, ištirpinto 1% H_2SO_4 tirpale, 0,5 ml askorbino rūgšties ištirpintos 16% $CuSO_4$ tirpale ir po sumaišymo, inkubuojama 10 min. 25 °C temperatūroje. Optinis tankis nustatomas spektrometriškai ties 700 nm bangos ilgiu.

Na, K-ATF-azės aktyvumas apskaičiuojamas pagal bendros ATF-azės ir Mg-ATF-azės aktyvumų skirtumą. Mg-ATF-azės aktyvumas nustatomas analogiškai, tik vietoje 0,6 ml trichloracto rūgšties į mišinį pridedamas 0,3 ml 0,05% strofantino tirpalas.

Nustatyta, kepenų, paveiktų CCl_4 Na, K-AF-azės aktyvumas sumažėja 3,5 karto, o paveikus pareikšta BAM, pagal 11 pavyzdį, jos aktyvumas padidėja 50%.

35 pavyzdys

BAM, gautas taip pat kaip 1-18 pavyzdžiuose, žiurkių, po poodinio CCl_4 įvedimo, kepenų hepatocitų reparacijos stiprinimo efektyvumas nustatomas pagal aminotransferazės kraujyje aktyvumo atstatymą ir žiurkių kepenų kalio (K^+) hepatocituose koncentraciją sekančiu būdu.

Gyvūnai, apdorojami kaip ir 34 pavyzdyje, aminotransferazės kraujyje aktyvumas patikrinamas test-sistemoje pagal specifinį nudažymą fotometriniu būdu (S.Reitman, S.Franklin. - American Journal of Clinical Pathology,- 1957- 18- 56).

Į 0,25 ml tirpalą turintį 0,1 M L-aspartato, 0,002 M 2-oksaglutarato ir 0,1 M fosfatinio buferinio tirpalo, pH 7,4, pridedama 0,05 ml žiurkių kraujo serumo ir inkubuojama 37 °C temperatūroje 60 min.

Po inkubacijos į tirpalą pridedama 0,001 M 2-4-dinitrofenilhidrazino ištirpinto 1 M HCl ir bandinys 20 min. paliekamas kambario temperatūroje, po to pridedama 2,5 ml 0,4 M NaOH, sumaišoma ir po 10 min. išmatuojamas optinis tankis 520 nm bangos ilgiu prieš kontrolinį tirpalą, kur vietoje 0,05 ml kraujo įvedama 0,05 ml fiziologinio tirpalo.

Kepenų, toksiškai paveiktų CCl_4 , pažeidimas yra lydimas hepatocitų suardymu ir aminotransferazės išėjimu, dėl ko jų aktyvumas kraujo serume padidėja 2 kartus.

Kalio (K^+) koncentracija bandomųjų žiurkių kepenų hepatituose nustatoma standartiniu liepsnos fotometrijos metodu, pagal Brikker, liepsnos fotometru.

Nustatyta, kad kepenų, paveiktų CCl_4 , Na, K-ATFazės aktyvumas sumažėja 3,5 karto, dėl ko 40% sumažėja K^+ koncentracija kepenų hepatituose.

O panaudojant BAM, gautą pavyzdyje 11, K^+ koncentracija atstatoma ne mažiau 43%.

Išradimas neapsiriboja šiais pavyzdžiais. Įvairūs variantai gali būti naudojami išradimo apibrėžties esmės ir apimties ribose.

BIOLOGIŠKAI AKTYVIOS MEDŽIAGOS SUDĖTIES IR SAVYBIŲ ANALIZĖ

Identifikuoti pareiškiamą BAM kitų biologiškai aktyvių medžiagų tarpe įmanoma tiesiogiai - atliekant biocheminę sudėties analizę, ir netiesiogiai - įvertinant imunomoduliuojantį BAM efektą.

Nustatyta, kad žymų organizmo imuninės sistemos sustiprėjimą, lyginant su kontrole, apsprendžia morfoplazmos ir glikokalikso ląstelių modifikuoti komponentai, kurių struktūra modifikuota, įeinantys į BAM sudėtį. Tai leidžia identifikuoti BAM pagal tokius rodiklius:

- a) Pagal žiurkių peritonealinio eksudato makrofagų aktyvumo padidėjimą, t.y., pagal makrofagų fermentinio aktyvumo, nustatomo NST-testu, padidėjimą ne mažiau kaip 54 % (naudojant eksperimente nitrotetrazolio mėlį - Vengrijos firmos "Reanal" NST testas) ir pagal fagocitarinio aktyvumo E.Colli padidėjimą ne mažiau kaip 39 %;
- b) Pagal žiurkių neutrofilų aktyvacijos kraujyje padidėjimą, t.y., pagal fermentinio aktyvumo, nustatomo NST testu, padidėjimą ne mažiau kaip 67 % (naudojant nitrotetrazolio mėlį - Vengrijos firmos "Reanal" NST testą) ir pagal fagocitarinio aktyvumo E.Colli padidėjimą ne mažiau kaip 44%;
- c) Pagal T-limfocitų blast-transformaciją - ne mažiau kaip 42 %, ir B-limfocitų - ne mažiau kaip 50 %;
- d) Pagal užkrūčio liaukos funkcinio aktyvumo padidėjimą, t.y., pagal timininio seruminio faktoriaus kiekio žiurkių kraujyje padidėjimą - ne mažiau kaip 167 %;
- e) Pagal žiurkių splenocitų natūralaus kilerinio aktyvumo padidėjimą - ne mažiau kaip 66 %;
- f) Pagal pajėgumą stabilizuoti žiurkių kepenų hepatocitų plazmines membranas po anglies tetrachlorido (CCl₄) įvedimo:

- pagal Na, K-ATF-azės aktyvumo atstatymą - ne mažiau kaip 24 %;
- pagal transferazės aktyvumo žiurkių kraujyje atstatymą - ne mažiau kaip 22 %;

- pagal kalio (K) ir natrio (Na) santykio žiurkių kepenų hepatocituose atstatymą ne mažiau kaip 13,8 %.

Palyginimų pagrindu naudojo kontroliniuose bandymuose įvedamą į organizmą konservantą, ištirpintą fiziologiniame tirpale.

Pateikiama BAM imunomoduliuojančių ir regeneruojančių efektų (savybių) sistema leidžia identifikuoti BAM pagal jos biologinį aktyvumą, t.y., kaip imunomoduliatorių. BAM ir jos pagrindu pagamintas preparatas turi tendenciją pasireikšti kaip organizmo imuninės sistemos apsauginių funkcijų, nukreiptų tiek vidinės patologijos eliminavimui (natūralių kilerių aktyvumo stimuliacija), tiek ir bendro organizmo atsparumo infekciniams susirgimams stiprinimui, stimulatorius, žymiai viršijantis aukščiau išdėstytų žinomų BAM rodiklius.

Eksperimentiškai nustatytos įvairių biologiškai aktyvių medžiagų imunomoduliacinės savybės pagal kompleksą rodiklių, identifikuojančių tiriamas medžiagas. Eksperimentų rezultatai pateikti 6 lentelėje, kurioje pateikti kiekybiniai efektų rodikliai žinomų BAM N 1, N 2, N 3, gautų pagal technologiją, aprašytą atitinkamai EP-A-02499563, SU-A-139404 ir US-A-4455302, ir pareikštos BAM, kurią atstovauja WS, TS ir LM grupės, apibendrinančios rezultatus:

WS - 1-4 pavyzdžių (morfoplazmos ir glikokalikso ląstelių komponentai);

TS - 7-9 pavyzdžių (termostabilūs morfoplazmos ir glikokalikso ląstelių komponentai);

LM - 11-13 pavyzdžių (mažamolekuliniai morfoplazmos ir glikokalikso ląstelių komponentai, kurių $M < 10,0$ kDa).

Kaip kontrolinį objektą tyrė natrio chlorido fiziologinį tirpalą su konservantu. Gauti rezultatai yra 6 lentelėje ir palyginimo būdu charakterizuoja pareiškiamą ir žinomas BAM. Pateikti rezultatai apibūdina pareiškiamos BAM, kuri gaunama kaip nenustatytos struktūros mišinys, charakteristikas ir būtinus BAM identifikacijai efekto, apsprendžiančio jos paskirtį, duomenis.

Be galimybės identifikuoti pareiškiamą medžiagą, 6 lentelės duomenų analizė taip pat leidžia įvertinti konkretų rezultatą, kuris gaunamas BAM pagalba ir kuris yra esminis biologinio aktyvumo padidėjimas dėka BAM esančių hidrolizės produktų, turinčių savyje modifikuotus morfoplazmos ir glikokalikso ląstelių su modifikuota struktūra komponentus, kurių įtaka žinomose BAM nenustatyta.

Pareikštos BAM ir jos pagrindu sudaryto preparato savybės yra glaudžiai susijusios su jos sudėtimi.

Pagal biocheminės analizės rezultatus (7 lentelė), BAM savo sudėtyje turi tokius organinius junginius, kaip polipeptidai, peptidai, aminorūgštys, surišti ir laisvi angliavandeniai, lipidai, nukleotidai ir kiti junginiai. 7 lentelės duomenys atskleidžia organinių junginių pasiskirstymą BAM sudėtyje pagal masę, naudojant pradinę žaliavą stambiuųjų raguočių embriono audinius. Be to, 7 lentelėje atsispindi pareikštos BAM įvairių grupių (WS, TS ir LM) gavimo rezultatai, pagal visus pareikštus būdus. Be būdo, kuriuo gaunama BAM-WS ir kurio įgyvendinime kaip žaliava naudojami gyvulinės kilmės audiniai, esantys morfoplazmos ir glikokalikso ląstelių modifikavimo proceso stadijoje, įgyvendinimo

rezultatų, 7 lentelėje taip pat yra pareikštos BAM gavimo termostabilių komponentų BAM-ST ir mažamolekulinių komponentų BAM-LM pavidale būdo įgyvendinimo rezultatai.

7 lentelės duomenys leidžia atlikti pareikšto ir žinomo BAM gavimo būdų palyginamąją analizę, būtent, palyginamąją žinomos ir pareikštos BAM analizę, turint mintyje tai, kad iš žinomų BAM geriausios pagal savo charakteristikas yra BAM N 3 (US-A-4455302), BAM N 2 (SU-A-139404) ir BAM N 1 (EP-A-0249563).

Pareiškiamos ir žinomų BAM specifinio aktyvumo palyginamoji analizė rodo (6 ir 7 lentelės), kad jų specifinis aktyvumas priklauso nuo ingredientų sudėties, kurių santykis žymiai įtakoja specifinio aktyvumo dydį.

Pareiškiamos BAM biocheminės sudėties charakteringa savybė yra buvimas angliavandenius turinčių komponentų, kurių modifikavimas žymia dalimi apsprendžia BAM savybes.

Angliavandenių kiekis aktyviausiose mažamolekulinių komponentų, turinčių molekulinę masę $M = 0,8-10,0$ kDa (oligonukleotidai, glikopeptidai, glikolipidai, nukleotidai) frakcijose (3, 4 ir 5 frakcijos 4 lentelėje), turi lemiamą reikšmę identifikuojant ir charakterizuojant pareiškiamą BAM.

Ingredientų specifinio aktyvumo ir sudėties (6 ir 7 lentelės) palyginamoji analizė rodo, kad didesnis pareiškiamo BAM aktyvumas, palyginus su analogais, koreliuoja su didesniu angliavandenių kiekiu komponentų su molekuline mase $M = 0,8-10,0$ kDa sudėtyje. Pareiškiamai medžiagai šie dydžiai yra: $6,8 \pm 3,5$ %; $7,5 \pm 3,5$ % ir $8,2 \pm 3,3$ %, tuo tarpu kai analogams - BAM N 1, N 2 ir N 3 jie yra ne daugiau $0,2\%$, $2,7 \pm 1,1$ % ir 3

$\pm 0,5 \%$, atitinkamai. Dar geriau ši priklausomybė koreliuoja su angliavandenių santykinio kiekiu kitų organinių medžiagų kiekio frakcijoje atžvilgiu.

Šiuo atžvilgiu esminis rodiklis yra angliavandenių ir peptidų kiekio komponentuose, kurių molekulinė masė $M = 0,8-10,0$ kDa (2 ir 3 lentelės), santykis, išreiškiamas (3) formule:

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

kurioje C_y ir C_p - atitinkamai angliavandenių ir peptidų koncentracijos komponentuose, kurių molekulinė masė $M = 0,8-10,0$ kDa.

Pareiškiamai BAM šis rodiklis turi reikšmę $G_3 = 0,25-0,60$, tuo tarpu žinomoms BAM jo reikšmė neviršija $G_z < 0,25$.

Tokiu būdu, rodiklio G reikšmė apibendrintai charakterizuoja hidrolizės produktų savybę ir priklauso nuo naudojamos pareikštame būde žaliavos, nuo nurodytos žaliavos apdorojimo operacijų visumos bei hidrolizės procesų įgyvendinimo režimų ir yra vienu iš pareiškiamos BAM biocheminės identifikacijos charakteringų rodiklių.

Pareiškiamos biologiškai aktyvios medžiagos ir bendra idėja susijusio pareiškiamo jos gavimo būdo požymių visuma ir vaistinis preparatas šios medžiagos pagrindu yra priežasties-pasekmės ryšiu susiję su BAM specifiniu aktyvumu.

PRAMONINIS PRITAIKOMUMAS

Išradimai, susiję su biologiškai aktyvia medžiaga, jos gavimo būdu ir vaistiniu preparatu pareiškiamos BAM pagrindu, pagrįsti pradinės žaliavos parinkimu, BAM ir preparato su garantuotu aukštu specifiniu aktyvumu gavimo proceso sąlygų parinkimu. Parinkta BAM gavimo technologija užtikrina rezultatų atsikartojamumą, t.y., leidžia standartizuoti pareikštos BAM su norimomis savybėmis, būtent su norimu fiksuotu imunomoduliuojančiu aktyvumu, apsprendžiančiu farmacinį, terapinį ir bendrą biologinį išradimo naudojimo efektą, gavimą.

Gaunami galutiniai produktai bendru atveju ir atskirais pareiškiamos BAM gavimo būdo įgyvendinimo atvejais yra lygiaverčiai savo biologinio poveikio charakteriu, bet skiriasi savo specifiniu aktyvumu. Todėl vienos ar kitos konkrečios BAM naudojimo tikslingumą apsprendžia objekto, kuriam ji skiriama, reikalavimai, t.y., veterinarijos ir/arba medicinos reikalavimai. Ryšium su tuo kiekvienu konkrečiu galutinio produkto panaudojimo atveju vieno ar kito BAM varianto pasirinkimą apsprendžia santykis tarp reikalavimų, keliamų jo imunomoduliaciniam aktyvumui ir bendram efektyvumui ir gavimo kainos (ekonomiškumo). Aukštas efektyvumas priemonės, turinčios savo sudėtyje pareiškiamos BAM-LM mažamolekulinių komponentų, kurių molekulinė masė $M \leq 10$ kDa, pilnai pasireiškia makrofagų, neutrofilų, limfocitų, natūralių kilių aktyvumo didinime, kas užtikrina regeneracinių procesų sustiprinimą (6 lentelė). Naminiams gyvuliams tokius efektus lydi papildomo priesvorio padidėjimas juos intesyviai penint (8 lentelė). Gydant kvėpavimo takų ir infekcinius susirgimus (para-gripas) toks privalumas ne tiek svarbus, ir šiuo atveju ekonomiškai tikslinga naudoti priemonę, turinčią savo sudėtyje tirpių vandenyje morfoplazmos ir glikokalikso ląstelių komponentų BAM-

WS. Gydoti uždegiminius procesus (mastitas), geriau naudoti priemonę, turinčią termostabilių komponentų BAM-TS.

Gaminant preparatą išoriniam naudojimui tepalo, žvakučių, gelių, kompresų, intranazalinio arba gyvulių girdymui skirtą tirpalą pavidale, vietoj BAM-LM ekonomiškai tikslinga naudoti BAM, turinčią savo sudėtyje termostabilių komponentų BAM-ST.

Siekiant gauti maksimalų efektą, tikslingiau naudoti pareiškiamą medžiagą organizmo imuninės sistemos apsauginių funkcijų, nukreiptų tiek vidinės patologijos eliminavimui (natūralių kelių aktyvumo stimuliavimas), tiek bendro organizmo atsparumo infekciniams susirgimams stiprinimui, stimuliacijai, kuri žymiai viršija aukščiau aptartų žinomų BAM analogiškų rodiklius.

Pareiškiamos BAM panaudojimas stambiųjų raguočių prieauglio infekciniams susirgimams gydyti (para-gripas, ūmus respiratorinis veršelių susirgimas) užtikrina gyvulių išgyjamą 82-93 % atvejų. Tuo tarpu panaudojant žinomas BAM tokiomis pačiomis sąlygomis stebimas išgyjimas ne daugiau kaip 75 % atvejų, o spontaniškas išgyjimas kontrolinėje grupėje yra 55-67 % atvejų ribose.

Pareiškiamas preparatas davė teigiamus rezultatus įvedant jį į organizmą uždegiminių procesų gydymui.

Pareiškiamos BAM panaudojimas profilaktikos tikslais sumažino veršelių sergamumą para-gripu iki 10 %, tuo tarpu kai naudojant žinomas priemones gyvulių sergamumas siekė 12-17 %, o kontrolinėje grupėje - 22-28 %.

Pareiškiamo preparato panaudojimas didino gyvulių atsparumą infekciniams susirgimams, tuo pačiu sumažindamas bandos kritimą.

Bendros biologinės naminių gyvulių būklės normalizavimas preparato pagalba pagerino gamybinius rodiklius, tame tarpe gyvosios masės priesvorio padidėjimą nepabloginant mėsos kokybės, priartindamas šiuos rodiklius prie genetiškai užprogramuoto lygio, įmanomo intensyviai penint. Ši savybė palankiai išskiria pareiškiamą BAM ir preparatus jo pagrindu nuo hormoninių ir kitokių augimo stimuliatorių, kurie, keldami kiekybinius rodiklius, negatyviai veikia homeostazę ir blogina produkcijos kokybę.

Pareiškiamos BAM ir preparato jos pagrindu įvedimas į organizmą gyvūno, kurio homeostazės parametrai nukrypę nuo normos, intensyviai penint užtikrina papildomą priesvorį, lygų vidutiniškai 37-100 % priesvorio kontrolinėje grupėje, nepaveiktoje pareiškiamą BAM. Tuo tarpu naudojant žinomas BAM - analogus (N 1, N 2 ir N 3), tokiomis pat sąlygomis papildomas priesvoris, lyginant su priesvoriu kontrolinėje grupėje, sudarė vidutiniškai 12-24 %.

Homeostazės parametrų normalizavimas taip pat didina:

- stambiųjų ir smulkiųjų raguočių pieno primilžį;
- naminių paukščių dėslumą;
- kailinių žvėrelių kailio kokybę;
- priauglio išgyvenimą;
- sunešto medaus kiekį ir pan.

Pareiškiamą BAM yra netoksiška, nesukelia pašalinių reakcijų (alergijos ir pan.).

Pareiškiamos BAM ir preparato jos pagrindu farmacinio, terapinio ir bendro biologinio efektų palyginamieji duomenys pateikti 8 lentelėje. Šios

lentelės duomenų analizė parodo, kad pareikštos BAM biologinis aktyvumas žymiai viršija analogų biologinį aktyvumą.

Tokiu būdu, pareiškiamą BAM ir preparatas jos pagrindu turi platų panaudojimo veterinarijoje ir medicinoje spektrą, ir gali būti naudojamas organizmo fiziologinės būklės normalizavimui gydant susirgimus, kurių eigą kontroliuoja organizmo imuninė sistema.

Pagal išradimą, pareiškiamą medžiagą ir preparatą jos pagrindu naudoja tokiu būdu. Nustato homeostazės parametrus, po to, jei yra nukrypimų nuo normos, stimuliuoja imuninę sistemą, įvesdami BAM, kol nurodyti homeostazės parametrai normalizuojasi.

Nurodytas imuninės sistemos stimuliavimas atliekamas aktyvuojant retikuloendotelinę sistemą, T- ir B-sistemas, neutrofilus ir/arba natūralių organizmo kilių populiaciją, kas užtikrina peritonealinio eksudato ir kraujo neutrofilų makrofagų aktyvumo padidėjimą in vitro, limfocitų blast-transformacijos reakcijos stimuliavimo padidėjimą in vivo, užkrūčio liaukos funkcinio aktyvumo stimuliavimo padidėjimą, splenocitų natūralaus kilių aktyvumo stimuliavimo padidėjimą in vivo, o taip pat kepenų hepatocitų reparacijos sustiprėjimą įvedus nuodingų medžiagų arba po dalinės hepatektomijos ir pan.

Šiuo tikslu pareiškiamos BAM ir preparato jos pagrindu įvedimo į organizmą būdas parenkamas iš eilės, susidedančios iš:

- injekcijos į raumenis dozėmis 0,005-0,5 ml/kg kūno masės, esant intervalams tarp injekcijų 1-7 dienos;
- inhaliacijos dozėmis 0,012-0,12 ml/kg kūno masės, esant intervalams tarp inhaliacijų 4-48 val.;

- sublingvaliai, dozėmis 0,012-0,12 ml/kg kūno masės, esant intervalams tarp dozių 4-48 val.;
- girdymas dozėmis 0,02-1,0 ml/kg kūno masės, esant intervalams tarp girdymų 1-10 dienų;
- peroraliai piliulėmis dozėmis 0,02-1,0 ml/kg kūno masės, esant intervalams 1-10 dienų;
- intranazaliai paros dozėmis 0,001-0,05 ml/kg kūno masės, esant intervalams tarp lašinimų 2-24 val.;
- aplikacijos ant gleivinės ar žaizdos paviršiaus kompresų, žvakučių, pabarstų, tepalų, taip pat gelių pavidale, arba jų kombinacijų pavidale - iki homeostazės parametrų normalizavimo.

Duomenys, patvirtinantys pareiškiamos BAM termostabilių komponentų BAM-ST pavidale ir preparato jos pagrindu, kuriame užpildu naudojome NaCl fiziologinį tirpalą, pavidale panaudojimo būdo efektyvumą, pateikti 9-12 lentelėse.

Lentelėse pateikta homeostazės parametrų normalizavimo efekto priklausomybė nuo aukščiau pateiktų dozių ir pareiškiamo preparato vartojimo būdo, kas buvo kontroliuojama sekant veršelių, pradžioje turėjusių nukrypimų nuo homeostazės parametrų normos, priesvorio dydį.

9-12 lentelėse pateikti pareiškiamo preparato efektyvumo rezultatai,

- įvedant injekcijomis į raumenis kas 3 dienos (9 lentelė);
- inhaliuojant kas 24 val.(10 lentelė).;
- girdant kas 7 dienas (11 lentelė);
- naudojant intranazaliai kas 12 val. (12 lentelė).

Pareiškiamos BAM įvedimas į organizmą pareiškiamo preparato pavidale stimuliuoja:

- infekcinių ligų gydymą (para-gripas, ūmus respiratorinis susirgimas);
- uždegiminių susirgimų gydymą (mastitai, plaučių uždegimas, endometritai);
- gyvulių atsparumą infekciniams ir uždegiminiams procesams;
- organizmo bendros biologinės būklės gerėjimą;
- gyvulių priesvorio augimą;
- kepenų audinių funkcinį aktyvumą, esant hepatitui;
- kepenų regeneraciją po dalinės hepatektomijos;
- kraujo formulės atsistatymą po nukraujavimų.

Pašalinių efektų nebuvimas naudojant BAM ir preparatą jos pagrindu ir duomenys apie farmacinį, terapinį ir bendrą poveikį gyvūno organizmui padarė įmanoma BAM ir preparato jos pagrindu klinikinę aprobaciją.

Tiriant grupę pacientų, nustatytas teigiamas poveikis į organizmo fiziologinę būklę, taip pat praktiškai pilna analogija su eksperimentinių ikiklinikinių tyrimų su gyvūnais rezultatais.

Pareiškiamos biologiškai aktyvios medžiagos gavimo būdas gali būti įgyvendintas tiek pramoninėmis, tiek laboratorinėmis sąlygomis.

1 Lentelė

Biologiškai aktyvios medžiagos (BAM) imunomoduliuojantys ir regeneruojantys efektai		BAM efektų kiekybinis rodiklis (pagal pavyzdžius)			
		N 1	N 2	N 3	N 4
1. Peritonealinio žiurkių eksudato makrofagų aktyvumo padidėjimas %, palyginus su kontroliniu	fermentinis aktyvumas (NST - testas)	52,3	54,2	71,0	58,3
	fagocitinis aktyvumas pagal <u>E.Coli</u>	37,3	39,1	54,5	43,8
2. Kraujo neutrofilų aktyvumo padidėjimas %, palyginus su kontroliniu	fermentinis aktyvumas (NST - testas)	66,7	71,2	85,0	75,4
	fagocitinis aktyvumas pagal <u>E.Coli</u>	44,5	49,8	59,8	52,2
3. Blast transformacijos reakcijos stimuliacija %, palyginus su kontroliniu	T - limfocitų	40,2	44,8	51,3	46,2
	B - limfocitų	48,7	50,2	61,0	55,2
4. Gemalinio timininio faktoriaus titro padidėjimas %, palyginus su kontroliniu		156,3	167,4	249,8	210,4
5. Žiurkių splenocitų natūralaus kilerio aktyvumo stimuliacija %, palyginus su kontroliniu.		65,7	66,1	78,5	72,3
6. Žiurkės hepatocitų reparacinių galimybių po CCl ₄ įvedimo, aktyvumo atstatymo stiprėjimas %, palyginus su kontroliniu.	Na, K - ATF-azės	20,1	24,3	29,1	26,7
	kraujo aminotransferazė	18,7	22,1	32,3	27,4
	K ⁺ koncentracija hepatocituose	10,3	13,8	19,8	16,8

1 Lentelės tęsinys

Biologiškai aktyvios medžiagos (BAM) imunomoduliuojantys ir regeneruojantys efektai		BAM efektų kiekybinis rodiklis (pagal pavyzdžius)					
		N 7	N 8	N 9	N 11	N 12	N 13
1. Peritonealinio žiurkių eksudato makrofagų aktyvumo padidėjimas %, palyginus su kontroliniu	fermentinis aktyvumas (NST - testas)	102,6	73,0	87,6	158,2	127,0	151,1
	fagocitarinis aktyvumas pagal E.Colli	73,9	54,7	64,1	124,7	116,1	122,4
2. Kraujo neutrofilų aktyvumo padidėjimas %, palyginus su kontroliniu	fermentatyvinis aktyvumas (NST - testas)	109,2	81,6	95,4	179,5	138,3	167,6
	fagocitinis aktyvumas pagal E.Colli	78,9	61,9	60,2	134,3	112,9	125,4
3. Blast transformacijos reakcijos stimuliacija %, palyginus su kontroliniu	T - limfocitų	79,7	59,3	69,2	149,3	120,3	141,3
	B - limfocitų	93,3	71,9	83,4	189,6	146,8	176,2
4. Gemalinio timininio faktoriaus titro padidėjimas %, palyginus su kontroliniu		364,3	273,1	307,4	706,0	543,8	650,8
5. Žiurkių splenocitų natūralaus kilerio aktyvumo stimuliacija %, palyginus su kontroliniu.		120,6	90,0	105,0	211,0	178,4	194,4
6. Žiurkės hepatocitų reparacinių galimybių po CCl ₄ įvedimo, aktyvumo atstatymo stiprėjimas %, palyginus su kontroliniu.	Na, K - ATF-azės	34,6	28,2	30,8	64,8	50,4	60,2
	kraujo aminotransferazė	53,6	38,8	45,2	82,0	59,2	75,6
	K ⁺ koncentracija hepatocituose	27,0	22,2	24,6	52,5	43,9	50,4

2 Lentelė

Organiniai junginiai	Organinių junginių, gautų pagal pavyzdžius ir esančių BAM masės % kiekis			
	N 1	N 2	N 3	N 4
Polipeptidai	26,0	16,3	21,8	20,5
Peptidai	10,0	11,6	20,0	11,9
Aminorūgštys	51,5	48,2	32,0	44,3
Angliavandeniai sekančioje sudėtyje:				
- aukštamolekulinio svorio junginiai su molekuline mase $M > 10,0$ kDa	2,0	0,3	1,1	0,6
- žemamolekulinio svorio junginiai su molekuline mase $M = 0,8 \div 10,0$ kDa	2,5	3,3	10,3	5,0
- laisvų monomerų arba junginių su molekuline mase $M < 0,8$ kDa	6,0	11,0	9,4	12,0
IŠ VISO:	10,0	14,6	20,8	18,2
Lipidai, nukleotidai ir kiti organiniai junginiai	2,0	9,3	5,4	5,1
VISO:	100,0	100,0	100,0	100,0
Angliavandenių ir peptidų kiekio santykis G	0,25	0,28	0,52	0,42

2 Lentelės tęsinys

G - koeficientas, charakterizuoja angliavandenių ryšį su molekuline mase $M=0,8 \div 10,0$ kiekio santykį su peptidų kiekiu.

Organiniai junginiai	Organinių junginių, gautų pagal pavyzdžius ir esančių BAM masės % kiekis					
	N 7	N 8	N 9	N 11	N 12	N 13
Polipeptidai	11,0	5,5	12,7	0,2	mažiau 0,3	0,3
Peptidai	21,0	13,6	18,6	19,1	14,9	22,5
Aminorūgštys	37,1	52,9	47,3	43,5	60,1	49,8
Angliavandeniai sekančioje sudėtyje:						
- stambiamolekuliniai junginiai su molekuline mase $M > 10,0$ kDa	0,6	0,2	0,4	0,2	0,2	0,2
- žemamolekuliniai junginiai su molekuline mase $M = 0,8 \div 10,0$ kDa	11,0	4,0	7,4	11,5	4,9	11,0
-laisvų monomerų arba junginių su molekuline mase $M < 0,8$ kDa	13,5	12,8	8,3	17,0	10,4	11,2
IŠ VISO:	25,1	17,0	16,1	28,7	15,5	22,4
Lipidai, nukleotidai ir kiti organiniai junginiai	5,8	11,0	5,3	8,5	9,2	5,0
VISO:	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
Angliavandenių ir peptidų kiekio santykis G	0,52	0,30	0,40	0,60	0,33	0,50

3 Lentelė

Kaitinimo temperatūra (termoapdirbimo) °C	Žiurkių peritonealinio eksudato makrofagų aktyvumas (<u>in vitro</u>), gautas veikiant pareikšta BAM, gauta naudojant skirtingas temperatūras, (%) palyginus su kontroliniu.	
	Fermentinio aktyvumo padidėjimas (NST - testas)	Fagocitinio aktyvumo padidėjimas pagal <u>E.Coli</u>
55	61,1 ± 2,2	52,3 ± 2,8
60	65,7 ± 3,8	55,1 ± 2,1
95	72,8 ± 4,8	64,3 ± 5,6
120	64,3 ± 5,1	58,3 ± 4,2
135	57,3 ± 5,3	43,0 ± 3,4

Skirtumai su kontrole teisingi esant $P < 0,05$

4 Lentelė

Frakcijos eilės Nr.	Frakcijos molekulinis svoris, M, kDa	Žiurkių peritonealinio eksudato makrofagų aktyvumas, agentas veikiant pareikštos BAM žemamolekulinėmis frakcijomis, (%) palyginus su kontrole
1	$M_1 > 50,0$	52,1 ± 4,8
2	$10,0 < M_2 < 50,0$	93,8 ± 7,6
3	$M_3 \leq 10,0$	148,4 ± 17,4
4	$M_4 \leq 5,0$	160,7 ± 15,1
5	$M_5 \leq 1,0$	120,5 ± 11,7
6	$M_6 \leq 0,8$	87,3 ± 8,7
7	$M_7 \leq 0,5$	53,4 ± 7,2

Skirtumai su kontrole teisingi esant $P < 0,05$.

- 60 -

5 Lentelė

Panaudojami gyvuliniai audiniai	Žiurkių peritonealinio eksudato makrofagų aktyvumas (<i>in vitro</i>), veikiant su BAM-TS, gautos naudojant įvairias medžiagas, (%) palyginus su kontroliniu	
	Fermentinio aktyvumo padidėjimas (NST - testas)	Fagocitinio aktyvumo padidėjimas pagal <u>E.Coli</u>
Intaktinių kepenų hepatocitai	32,2 ± 5,4	30,8 ± 2,7
Intaktinis raumeninis suaugusių gyvūnų audinys	43,6 ± 6,8	35,2 ± 2,6
Sėklidžių spermatogonijos ir spermatoцитai		
Žarnyno epitelinis audinys	63,8 ± 3,5	55,4 ± 3,2
Kepenų hepatocitai po CCl ₄ įvedimo	68,2 ± 6,3	61,3 ± 5,2
Kaulų čiulpų ląstelės		
Varliagyvių galūnių atsistatantis audinys*	72,1 ± 4,2	64,4 ± 4,3
Embrioniinis raumeninis audinys	74,2 ± 6,1	67,5 ± 4,1
	82,5	70,2
Žiurkių regeneruotų kepenų hepatocitai po hepatektomijos	87,3	77,4
	83,7 ± 5,2	73,6 ± 4,8
	94,8 ± 5,7	78,8 ± 5,6

Skirtumai palyginus su kontrole teisingi esant $P < 0,05$.

* Audinys, kurio rodikliai gauti konkrečiai atlikus eksperimentą.

Biologiškai aktyvios medžiagos (BAM) imunomoduliuojantys ir regeneruojantys efektai		Efektų kiekybinis rodiklis (pagal pavyzdžius)					
		Žinomų BAM			Pareikštų BAM		
		N 1	N 2	N 3	WS	TS	LM
1. Peritonealinio žiurkių eksudato makrofagų aktyvumo padidėjimas %, palyginus su kontrole	fermentinis aktyvumas (NST - testas)	27,1 ±2,6	42,2 ±2,4	46,8 ±4,3	62,6 ±8,4	87,8 ±4,8	142,6 ±15,6
	fagocitinis aktyvumas pagal <u>E.Colli</u>	15,6 ±2,1	21,4 ±4,2	33,4 ±4,3	46,8 ±7,7	64,3 ±9,6	120,4 ±4,3
2. Kraujo neutrofilų aktyvumo padidėjimas %, palyginus su kontrole	fermentinis aktyvumas (NST - testas)	33,8 ±5,9	60,6 ±3,7	67,2 ±3,8	76,2 ±8,8	95,4 ±13,8	158,9 ±20,6
	fagocitinis aktyvumas pagal <u>E.Colli</u>	25,4 ±1,6	34,6 ±3,7	44,2 ±5,7	52,3 ±5,7	70,4 ±8,5	123,6 ±10,7
3. Blast transformacijos reakcijos stimuliacija %, palyginus su kontrole	T - limfocitų	24,6 ±2,8	25,1 ±3,7	38,4 ±4,6	46,6 ±4,7	69,5 ±10,2	134,8 ±14,5
	B - limfocitų	22,1 ±3,2	28,8 ±2,4	46,3 ±4,7	55,6 ±5,4	82,6 ±10,7	168,2 ±21,4
4. Gemalinio timininio faktoriaus titro padidėjimas %, palyginus su kontrole		52,4 ±4,2	56,7 ±6,2	117,8 ±9,1	208,6 ±41,2	318,7 ±45,6	624,7 ±81,3
5. Žiurkių splenocitų natūralaus kilerio aktyvumo stimuliacija %, palyginus su kontrole.		65,6 ±4,8	17,6 ±4,2	53,8 ±5,4	72,3 ±6,2	105,3 ±15,3	194,7 ±16,3
6. Žiurkės hepatocidų reparacinių galimybių po CCl ₄ įvedimo, aktyvumo atstatymo stiprėjimas %, palyginus su kontrole.	Na, K - ATF-azės	0	13,2 ±3,1	22,6 ±3,4	26,7 ±2,4	31,4 ±3,2	57,6 ±7,2
	kraujo aminotransferazė	0	0	23,4 ±4,8	27,2 ±5,1	46,2 ±7,4	70,6 ±11,4
	K ⁺ koncentracijos hepatocituose	0	5,2 ±1,2	14,2 3,1	16,8 ±3,0	24,6 ±2,4	48,2 ±4,3

Skirtumas su kontrole yra teisingas esant $P > 0,05$.

7 Lentelė

Organiniai junginiai	Organinių junginių, esančių BAM kiekis masės %					
	Žinomoje			Pareikštoje		
	N 1	N 2	N 3	WS	TS	LM
Polipeptidai	72,7 ±9,4	47,7 ±8,7	32,1 ±6,1	20,0 ±3,5	9,1 ±3,6	mažiau 0,3
Peptidai	13,5 ±2,1	35,8 ±7,4	16,3 ±3,2	15,0 ±5,0	17,3 ±3,7	18,7 ±3,8
Aminorūgštys	4,7 ±1,7	3,7 ±0,8	31,7 ±6,2	40,1 ±8,1	45,0 ±7,9	51,8 ±8,3
IŠ VISO:	90,9 ±6,0	86,9 ±5,1	80,1 ±5,1	75,1 ±5,1	71,4 ±4,8	70,5 ±5,3
Angliavandeniai sekančioje sudėtyje:						
- aukštamolekulinio svorio junginiai su molekuline mase $M > 10,0$ kDa	0,5 ±0,2	0,9 ±0,2	1,9 ±0,8	0,7 ±0,4	0,4 ±0,2	mažiau 0,2
- žemamolekulinio svorio junginiai su molekuline mase $M = 0,8 \div 10,0$ kDa	mažiau 0,2	2,7 ±1,1	3,0 ±0,5	6,8 ±3,5	7,5 ±3,5	8,2 ±3,3
- laisvų monomerų arba junginių su molekuline mase $M < 0,8$ kDa	7,3 ±2,4	2,1 ±0,6	10,2 ±2,7	10,0 ±2,4	12,7 ±2,9	13,7 ±3,5
IŠ VISO:	8,0 ±1,8	5,7 ±1,6	14,9 ±2,7	17,7 ±3,1	20,6 ±4,5	22,2 ±6,6
Lipidai, nukleotidai ir kiti organiniai junginiai	1,1 ±0,3	7,4 ±2,1	5,0 ±1,6	7,2 ±2,1	8,0 ±2,7	7,1 ±2,1
VISO:	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
Angliavandenių ir peptidų kiekio santykis G*	<0,01	0,08	0,18	0,45	0,43	0,44
Sausos liekanos BAM svoris (mg/ml)	20,0 ±4,2	11,4 ±3,7	32,6 ±9,6	12,8 ±3,6	8,4 ±2,2	6,1 ±1,8
Antiseptiko svoris (mg/ml)	-	-	-	0,7	0,7	0,7
BAM koncentracija miltelių kompozicijoje, masė %	-	-	-	94,8 ±1,1	92,3 ±1,5	89,7 ±2,2

Skirtumas su kontrole yra teisingas esant $P < 0,05$

* Reikšmės skaičiuotos pagal statistinius dydžius, iš lentelės.

8 lentelė

Farmacinis, terapinis ir bendras biologinis efektas naudojant biologiškai aktyvią medžiagą (BAM)			Kiekinė efekto charakteristika					
			Žinoma BAM			Pareikšta BAM		
			N 1	N 2	N 3	WS	ST	LM
1. Uždegiminiai procesai	Karvių mastitai, pasveikimo %	Bandymas	56±8	66±6*	70±5	76±3	83±4	88±5
		Kontrolė	59±7	57±6	61±5	58±8	63±7	53±8
	Plaučių uždegimas, pasveikimas %	Bandymas	55±8	64±7*	69±6	78±5	89±6	91±5
		Kontrolė	58±7	60±7	55±7	51±8	61±6	48±6
2. Infekciniai susirgimai	Paragripas ir stiprus respiratorinis susirgimas, pasveikimas %	Bandymas	55±5*	65±7	70±6	82±6	90±7	93±5
		Kontrolė	60±5	62±6	64±7	58±6	61±7	67±5
3. Veršelių viršsvorio padidėjimas %, palyginus su kontroliniu			-12±* 10	15±6	24±7	37±7	58±8	102± 15
4. Aštri toksikacija LD ₅₀ , ml/mg (mg/kg) kūno masės			daugiau 25 (260)			daugiau 25 (260)		

Skirtumas su kontrole yra teisingas esant $P < 0,05$ * $P > 0,05$

- 64 -

9 lentelė

Efektyvumas leidžiant injekcijas į raumenis					
Kiekis ml/kg kūno masei	mažiau 0,005 (0,001)	0,005	0,05	0,5	daugiau 0,5 (1,0)
Prieauglis, %, palyginus su kontroline grupe	32±2	47±2	55±5	61±5	42±3

Skirtumas su kontrole yra teisingas, esant $P < 0,05$

10 lentelė

Inhaliacijų efektyvumas					
Kiekis ml/kg kūno masei	0,001	0,012	0,05	0,12	0,6
Prieauglis, %, palyginus su kontroline grupe	32±2	47±2	55±5	61±5	42±3

Skirtumas su kontrole yra teisingas, esant $P < 0,05$

11 lentelė

Girdymo efektyvumas					
Kiekis ml/kg kūno masei	0,001	0,01	0,05	0,5	2,0
Prieauglis, %, palyginus su kontroline grupe	10±4	32±3	35±3	42±3	30±4

Skirtumas su kontrole yra teisingas, esant $P < 0,05$

12 lentelė

Efektyvumas vartojant intranazaliai					
Kiekis ml/kg kūno masei	0,0005	0,001	0,005	0,05	5,0
Prieauglis, %, palyginus su kontroline grupe	3±1	12±2	17±3	20±4	8±2

Skirtumas su kontrole yra teisingas, esant $P < 0,05$

IŠRADIMO APIBRĖŽTIS

1. Biologiškai aktyvi medžiaga, turinti imunomoduliuojančią susmulkinto gyvulinio audinio ingredientų vandenyje tirpių organinių junginių hidrolizės produktų savybę, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad hidrolizės produktų sudėtyje turi termostabilius žemamolekulinius morfoplazmos ir glikokalikso ląstelių komponentus, modifikuotus embriogenezės ir/arba proliferacijos procesuose, ir/arba ląstelių diferencijacijos, ir/arba patalogijos, prieš ir/arba lydimos regeneracijos ir/arba audinių reparacijos, procesuose.
2. Medžiaga pagal 1 punktą, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad modifikuotų morfoplazmos ir glikokalikso ląstelių komponentų sudėtyje turi termostabilių $T_H < 120^{\circ}\text{C}$ komponentų.
3. Medžiaga pagal 2 punktą, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad turi termostabilių komponentų 30-100% masės kiekio.
4. Medžiaga pagal 1 punktą, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad modifikuotų morfoplazmos ir glikokalikso ląstelių žemamolekulinių komponentų masė $M \leq 10,0 \text{ kDa}$
5. Medžiagą pagal 4 punktą, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad turi žemamolekulinių komponentų 30-100% masės kiekio.
6. Medžiaga pagal 1 arba 2, arba 3, arba 4, arba 5 punktus, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad savo hidrolizės produktų su modifikuotais morfoplazmos ir glikokalikso ląstelių komponentais sudėtyje turi organinių junginių masės (%)

Polipeptidai -

iki 26,0

Peptidai -	10,0-22,5
Aminorūgštys -	32,0-60,1
Angliavandeniai -	10,5-28,7
Lipidai, nukleotidai ir kiti organiniai junginiai -	2,0-11,0

7. Medžiaga pagal 6 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad organinių junginių sudėtyje turi angliavandenių santykiu, masės (%)

- stambiamolekulinių junginių, turinčių molekulinę masę $M_{yb} > 10,0 \text{ kDa}$ - iki 2,0
- žemamolekulinių junginių, turinčių molekulinę masę $M_{yn} = 0,8 - 10,0 \text{ kDa}$ - 2,5-11,5
- laisvų monomerų $M_{ym} < 0,8 \text{ kDa}$ - 6,0-17,0

8. Biologiškai aktyvios medžiagos, turinčios imunomoduliuojančią savybę, gavimo būdas, apimantis plautos žaliavos iš gyvulio audinio susmulkinimą, gautų ingredientų hidrolizę, hidrolizės produktų atskyrimą filtracija ir supernatanto, kaip galutinio produkto išskyrimą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad žaliavai naudoja gyvulinį audinį, modifikuotą embriogenezės ir/arba proliferacijos procesų metu, ir/arba ląstelių diferenciacijos, ir/arba patologijos, prieš ir/arba lydimos regeneracijos ir/arba audinių reparacijos, o prieš hidrolizę homogenizuoja ir valo nesuirusius audinio elementus, išskiria supernatantą, turintį ingredientų su morfolazmos ir glikokalikso ląstelėmis.

9. Būdas pagal 8 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad žaliavai naudoja audinį, paimtą iš tokios eilės: embrioninis audinys, diferencijuotų užkrūčio liaukos timocitų audinys, sėklidžių spermatogonijos ir spermatocitai, kaulų čiulpų ląstelės, epitelinis žarnyno audinys, placenta, atsistatantis odos audinys, regeneruotų kepenų audinys, varliagyvių galūnių atsistatantis audinys, patalogiškai pakitęs audinys, paimtas prieš regeneraciją, arba jų bet kokia kombinacija.

10. Būdas pagal 8 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad nuo nesuirusių audinio elementų po homogenizacijos fiziologiniame ir/arba buferiniame tirpale, valo filtravimo ir/arba centrifūgavimo būdu, greičiu 150-250 g per 10 min.

11. Būdas pagal 8 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad iki homogenizacijos žaliavą iš gyvulinio audinio susmulkina iki visiško ląstelių suirimo, po to ekstrahuoja, papildomai plauna, flitruoja ir/arba centrifuguoja, greičiu 300-15000 g per 10-20 min. iki išskiria ekstraguotą susmulkintą audinį.

12. Būdas pagal 8 arba 9, arba 10, arba 11 punktus, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad hidrolizuojamų ingredientų sudėtyje yra morfoplazmos ir glikokalikso ląstelių komponentų 30-60% nuo bendros organinių junginių masės.

13. Būdas pagal 8 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad hidrolizuoja $T_p=4-45^{\circ}\text{C}$ temperatūroje.

14. Būdas pagal 14 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad hidrolizuoja kartu su konservantu.

15. Būdas pagal punktus 8 arba 9, arba 10, arba 11, arba 13, arba 14, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad hidrolizės produktų ingredientus termiškai apdirba $T_H=60-120^{\circ}\text{C}$ temperatūroje iki pilnos termolabilių komponentų denatūracijos ir filtruoja ir/arba centrifuguoja, greičiu 1500 g per 20-40 min. ir išskiria supernatantą, kaip galutinį turintį termostabilių komponentų, produktą.

16. Būdas pagal punktą 8 arba 9, arba 10, arba 11, arba 13, arba 14, b e s i s k i r i a n t i s tuo, ingredientų hidrolizės produktus frakcionuoja per pusiau pralaidžią plėvelę dializės ir/arba ultrafiltracijos, ir/arba gelfiltracijos būdu iki žemamolekulinių komponentų su molekuline mase $M < 10,0$ kDa frakcijos, kaip galutinio produkto išskyrimo.

17. Būdas pagal 15 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad ingredientų hidrolizės produktus frakcionuoja dializės per pusiau pralaidžią plėvelę ir/arba ultrafiltracijos, ir/arba gelfiltracijos būdu iki žemamolekulinių komponentų su molekuline mase $M < 10,0$ kDa frakcijos, kaip galutinio produkto išskyrimo.

18. Preparatas, turintis biologiškai aktyvią gyvulinio audinio ingredientų hidrolizės produktų medžiagą ir užpildą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad biologiškai aktyvi medžiaga hidrolizės produktų sudėtyje turi termostabilių, žemamolekulinių morfoplazmos ir glikokalikso ląstelių komponentų, modifikuotų embriogenezės ir/arba proliferacijos procesuose, ir/arba ląstelių diferenciacijos, ir/arba patologijos, prieš ir/arba lydimos regeneracijos ir/arba audinių reparacijos, 0,001-85% masės preparate.

19. Preparatas pagal 18 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad biologiškai aktyvi medžiaga turi organinių junginių tokiu masės santykiu, %

Poliipeptidai -	iki 26,0
Peptidai -	10,0-22,5
Aminorūgštys -	32,0-60,1
Angliavandeniai -	10,5-28,7
Lipidai, nukleotidai ir kiti organiniai junginiai -	2,0-11,0

20. Preparatas pagal 18 ir 19 punktus susidedantis iš 0,001-85% biologiškai aktyvios medžiagos ir 15,0-99,999% užpildo, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad panaudojamas žmonių ir gyvulių fiziologinei būklei

normalizuoti farmaciškai efektyviu kiekiu injekcijomis į raumenis ir/arba inhaliacijomis ir/arba sublingvaliai ir/arba girdymui, ir/arba piliulėmis ir/arba internazaliai ir/arba aplikacijomis.