

МАЛЬГИНА ДАРЬЯ ЮРЬЕВНА

**РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИИ ГЕМОДЕРИВАТА
ИЗ ОТХОДА ПРОИЗВОДСТВА ИНТЕРФЕРОНА
И ПЕРСПЕКТИВЫ ЕГО ИСПОЛЬЗОВАНИЯ**

14.04.01 - Технология получения лекарств

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата фармацевтических наук

Пермь 2014

Работа выполнена в государственном бюджетном образовательном учреждении высшего профессионального образования «Пермская государственная фармацевтическая академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научный руководитель:

Казьянин Александр Викторович

доктор медицинских наук, профессор, ГБОУ ВПО «Пермская государственная фармацевтическая академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научный консультант:

Волкова Лариса Владимировна

доктор медицинских наук, ГБОУ ВПО «Пермский национальный исследовательский политехнический университет», профессор кафедры химии и биотехнологии

Официальные оппоненты:

Зубкова Наталия Васильевна

доктор фармацевтических наук, ФГУП «НПО «Микроген» Министерства здравоохранения Российской Федерации, заместитель начальника управления науки, инновационного развития и внедрения новых препаратов

Первушкин Сергей Васильевич

доктор фармацевтических наук, профессор, ГБОУ ВПО «Самарский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, заведующий кафедрой фармацевтической технологии

Ведущая организация:

Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита состоится «15» апреля 2014 года в 14.00 часов на заседании диссертационного совета Д 208.068.01 при ГБОУ ВПО «Пермская государственная фармацевтическая академия» Министерства здравоохранения РФ по адресу: 614990, г. Пермь, ул. Полевая, 2, тел. (342) 233-55-01.

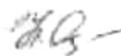
С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ГБОУ ВПО «Пермская государственная фармацевтическая академия» Министерства здравоохранения РФ по адресу: 614070, г. Пермь, ул. Крупской, 46.

Дата размещения объявления о защите диссертации на сайте Министерства образования и науки Российской Федерации <http://www.mon.gov.ru> «__»_____ 2014 г.

Диссертация, автореферат и объявление о защите диссертации размещены на сайте ГБОУ ВПО ПГФА <http://www.pfa.ru> «__»_____ 2014 г.

Автореферат разослан «__»_____ 2014 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета



Н. В. Слепова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Создание и освоение новых технологий является важной задачей современных биотехнологических предприятий. Основной причиной совершенствования или смены существующих технологий выступает стремление грамотно и экономически целесообразно использовать дорогостоящее сырье. Например, это касается производства препаратов крови человека. Высокая ценность белков человеческой крови придает особое значение необходимости полного и рационального использования всех имеющихся сырьевых геморесурсов, в том числе и отходов.

При производстве человеческого лейкоцитарного интерферона в результате фракционирования лейкоэритроцитомассы образуется белковый отход в виде эритроцитомассы. До настоящего времени одним из способов переработки данного продукта явилась технология неспецифического ферментативного расщепления исходного субстрата с получением питательной среды для культивирования бактериофагов [Ворошилова, 1992], что является недостаточным для грамотной утилизации всего образующегося объема эритроцитомассы. Филиалы научно-производственного объединения «Микроген», перерабатывающие кровь человека, сосредоточены в таких городах России, как Пермь, Уфа, Томск и др. [URL: www.microgen.ru]. Подобный продукт образуется также на станциях переливания крови, количество которых в стране по данным на 2013 год, составляет 79, и это число постоянно растет [URL: http://mxkr.ru/ru/stantsii_perelivaniya_krovi]. Таким образом, поиск методов переработки эритроцитомассы с целью получения функциональных продуктов на ее основе не только приведет к оптимизации и повышению рентабельности производств, в которых используется кровь человека, но и к минимизации технологических потерь со снижением неблагоприятного влияния не утилизируемых белковых отходов на экологическое равновесие в природе.

Одним из перспективных методов выделения биологически активных компонентов из эритроцитомассы донорской крови является гидролиз – один из распространенных методов переработки белковых веществ для производства ценных продуктов. На основе белковых гидролизатов получают препараты, которые широко применяют на практике. Например, в медицине – как кровезаменители для парентерального питания; в ветеринарии – для повышения резистентности животных к заболеваниям; в биотехнологии – как источник аминокислот и пептидов для бактериальных и культуральных питательных сред; в пищевой промышленности – в качестве улучшителей вкусовых и энергетических характеристик продуктов питания; в косметологии – как основные составляющие косметических препаратов [Балдынова Ф.П., 2010; Жулидов И.М. и др., 2011; Кальницкая О.И. и др., 2012]. Понятно, что качество и свойства белковых гидролизатов, предназначенных для различных областей применения, обусловлены составом исходного сырья, способом гидролиза и последующей обработкой полученного продукта.

Варьирование способов производства белковых гидролизатов позволяет получать продукты с заданными свойствами. В зависимости от содержания аминокислот и наличия полипептидов соответствующей молекулярной массы может быть выявлена область наиболее эффективного использования гидролизатов. Так, в медицине целесообразно использовать гидролизаты, содержащие до 20% свободных аминокислот. В ветеринарной практике для повышения естественного иммунитета животных преимущественным требованием является высокое содержание в препаратах пептидов (до 80%) [Максимюк Н. Н. и др., 2009]. Но основным условием при

использовании белковых гидролизатов в различных областях биотехнологии является сбалансированный и полноценный аминокислотный состав. В этом случае подбор гидролизующего агента играет первостепенную роль.

Цель исследования – создание унифицированной технологии депротеинизированного гемодеривата эритромаcсы крови человека (далее – гемодеривата) с оценкой возможности его применения в производстве медицинских иммунобиологических препаратов.

Основные задачи исследования:

1. Разработать технологию ферментативного гидролиза эритромаcсы крови человека для получения гемодеривата.
2. Оценить физико-химические свойства гемодеривата.
3. Разработать оптимальный состав полусинтетической питательной среды с добавлением гемодеривата для культивирования перевиваемой клеточной линии почки эмбриона свиньи (SPEV).
4. Оценить эффективность использования клеточной линии SPEV, полученной на питательной среде, содержащей гемодериват, при определении противовирусной активности полуфабриката человеческого лейкоцитарного интерферона.
5. Изучить спектр биологической активности гемодеривата.

Личный вклад автора. Все приведенные в диссертации данные были получены лично автором на базе ГБОУ ВПО «Пермская государственная фармацевтическая академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации и в филиале ФГУП «НПО «Микроген» Министерства здравоохранения Российской Федерации «Пермское НПО «Биомед».

Научная новизна. Разработана оригинальная технология ферментативного гидролиза эритромаcсы, позволяющая получать низкомолекулярную фракцию пептидов, обладающую высокой биологической активностью благодаря полноценному аминокислотному составу исходного сырья, безопасную в вирусологическом отношении. Особенность технологии заключалась в разработке способа подготовки сырья, осветления и депротеинизации для изготовления готового продукта. В результате получали препарат низкомолекулярных пептидов, нетоксичный для клеточной линии SPEV. Показано, что раствор гемодеривата обладает антибактериальной активностью в отношении штаммов условно-патогенной аэробной микрофлоры. Также выявлено свойство раствора гемодеривата, выраженное в стимуляции роста ворса при кожных аппликациях морским свинкам.

Впервые разработан вариант приготовления ростовой питательной среды, содержащей гемодериват. Проведена оценка пролиферативной активности питательной среды, содержащей гемодериват, с использованием клеточной линии SPEV. Доказано, что клеточная линия SPEV, полученная на питательной среде с гемодериватом, может быть применена в технологическом процессе производства человеческого лейкоцитарного интерферона при оценке его противовирусной активности.

Теоретическое и практическое значение работы. Теоретическая значимость результатов исследований состоит в расширении знаний о биологических свойствах производных крови человека. Показана возможность получения гемодеривата из

побочного продукта технологии человеческого лейкоцитарного интерферона – эритроцитной массы донорской крови. Доказана большая эффективность гемодеривата в качестве компонента питательной среды для выращивания клеточной линии SPEV по сравнению со стандартной средой. Выявлено свойство гемодеривата, выраженное в стимулировании роста ворса на экспериментальной модели – морской свинке. Полученные результаты явились обоснованием дальнейшего изучения и возможности использования побочного продукта технологии человеческого лейкоцитарного интерферона – эритроцитной массы донорской крови.

В ходе выполнения данных исследований разработаны:

- технология депротеинизированного гемодеривата из побочного продукта технологии человеческого лейкоцитарного интерферона – эритроцитной массы крови человека;

- состав питательной среды, содержащей гемодериват, для культивирования клеточной линии SPEV, используемой, в свою очередь, при оценке противовирусной активности человеческого лейкоцитарного интерферона. На базе Пермского филиала НПО «Микроген», цеха препаратов крови, отделения интерферона установлен эффект питательной среды, содержащей гемодериват, превосходящий по индексу пролиферации и времени таковой на стандартной среде 199. Питательная среда, содержащая гемодериват, является перспективной для использования в производстве человеческого лейкоцитарного интерферона с целью совершенствования процесса контроля качества препарата, а также стремления к малоотходному или безотходному биотехнологическому производству.

Апробация работы. Основные положения и результаты диссертационной работы доложены на XVIII Российском национальном конгрессе «Человек и лекарство» (Москва, 2011); XLIX международной научной студенческой конференции, секция «Биология» (Новосибирск, 2011); научно-практической конференции «Актуальные проблемы науки медицинских и фармацевтических вузов: от разработки до коммерциализации» (Пермь, 2011); XIII региональной научно-практической конференции студентов и молодых ученых «Химия. Экология. Биотехнология- 2011» (Пермь, 2011); 50-ой юбилейной международной научной студенческой конференции «Студент и научно-технический прогресс» (Новосибирск, 2012); XIV региональной научно-практической конференции студентов и молодых ученых «Химия. Экология. Биотехнология-2012» (Пермь, 2012); инвестиционном форуме Startup Bazaar (Новосибирск, 2012); международной конференции молодых ученых «Биология – наука XXI века» (Пушино, май 2012); 17-ой международной Пушинской школе-конференции молодых ученых «Биология – наука XXI века» (Пушино, 2013); XV международном конгрессе МАКМАХ/ESCMID по антимикробной терапии (Москва, 2013).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 12 научных работ, включая 2 статьи в журналах, рекомендованных высшей аттестационной комиссией для публикации результатов научных исследований по кандидатским диссертациям. Получено решение о выдаче патента на изобретение, декабрь 2013, заявка №2012123195 [<http://www.fips.ru/cdfi/fips.dll?ty=29&docid=2012123195&cl=9&path=http://195.208.85.248/Archive/PAT/2013FULL/2013.12.10/DOC/RUNWA/000/002/012/123/195/document.pdf>].

Объем и структура диссертации. Работа изложена на 146 страницах машинописного текста, содержит 25 таблиц, 18 рисунков, 2 приложения. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, двух глав экспериментальных исследований, заключения, выводов, списка цитируемой литературы, включающего 134 источника, из них 99 отечественных и 35 иностранных авторов.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Технология гемодеривата из эритроцитной массы донорской крови – побочного продукта технологии человеческого лейкоцитарного интерферона.
2. Результаты исследований физико-химических свойств гемодеривата, критерии контроля воспроизводимости технологии гемодеривата.
3. Состав питательной среды, содержащей гемодериват, для выращивания клеточной линии SPEV. Методы контроля и оценки биологической активности готовой питательной среды, содержащей гемодериват.
4. Эффективность использования питательной среды, содержащей гемодериват, для контроля качества человеческого лейкоцитарного интерферона.
5. Характеристика спектра биологических свойств гемодеривата и возможности его применения в технологии лекарственных препаратов.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности.

Научные положения диссертации соответствуют формуле специальности 14.04.01 – технология получения лекарств. Результаты проведенного исследования соответствуют области исследования специальности, конкретно пункту 7 паспорта 14.04.01 – технология получения лекарств.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Первая глава посвящена анализу данных литературы, касающихся характеристики побочных продуктов современных производств препаратов крови, их биологического потенциала, особенностей методов переработки с учетом биотехнологических принципов. Приведены примеры отраслей использования продуктов, полученных на основе отходов технологий различных препаратов человеческой крови. Даны сведения, обосновывающие необходимость поиска новых путей утилизации ценных в биологическом смысле отходов препаратов крови. Изложены факты о биотехнологическом потенциале эритроцитной массы крови человека, которая, в свою очередь, является побочным продуктом технологии человеческого лейкоцитарного интерферона.

Во второй главе приведены основные материалы и методы, использованные при проведении экспериментальных исследований. В качестве исходного сырья для выделения гемодеривата применяли побочный продукт производства человеческого лейкоцитарного интерферона – эритроцитную массу, полученную после фракционирования лейкоэритроцитной массы с использованием в качестве осадителя раствора метилцеллюлозы и дальнейшего отделения лейкоцитной массы от эритроцитов.

Применяли методы контроля физико-химических и цитологических параметров исходного сырья – эритроцитной массы крови человека: определяли наличие гемотрансмиссивных инфекций методом полимеразной цепной реакции (на базе донорского пункта филиала ФГУП «НПО «Микроген» Министерства здравоохранения РФ «Пермского НПО «Биомед»), концентрацию аминного азота,

хлоридов, значение рН, подсчет форменных элементов с целью дальнейшего мониторинга эффективности обработки сырья перед гидролизом. Для гидролиза исходного субстрата применяли очищенные ферментные препараты пепсина и трипсина импортного производства (США). Для мониторинга параметров хода процесса гидролиза эритромы использовали потенциометрический метод контроля значения рН для поддержания его на необходимом уровне. Показателем эффективности гидролиза принимали значения концентрации аминного азота. При разработке технологии гемодеривата оптимальное время гидролиза эритромы соответствовало моменту окончания нарастания количества аминного азота.

Ввиду содержания в объекте ферментативного расщепления красного пигмента, который придавал конечному продукту характерную окраску, гидролизат подвергали осветлению модифицированным методом с использованием разбавленной перекиси водорода. Для очистки гемодеривата применяли центрифугирование, полученную надосадочную жидкость в стерильных условиях фильтровали через мембрану с диаметром пор 0,22 мкм. Для стабильности при хранении гемодериват высушивали лиофильно. Лиофилизацию полученных образцов осуществляли с помощью аппарата для сублимирования ТГ-50 (Германия) на базе филиала ФГУП «НПО «Микроген» Министерства здравоохранения РФ «Пермского НПО «Биомед».

Определение молекулярных параметров раствора гемодеривата проводили с использованием метода ВЭЖХ при длине волны 280 нм с использованием хроматографических колонок фирмы «Knauer» с сорбентом Диасфер-110-Диол. Аминокислотный состав гемодеривата определяли на анализаторе аминокислот Т339 (производства Чехии).

Для оценки биологических свойств гемодеривата *in vitro* использовали биообъекты такие, как культура эпителиоподобных клеток почки эмбриона свиньи SPEV (определение цитотоксичности и пролиферативных свойств), культура рекомбинантного светящегося штамма *E.coli Lum+*, а также культуры условно-патогенной аэробной микрофлоры, представленной *S. epidermidis 3449*, *S. epidermidis 19*, *S. aureus 4570*, *S. aureus 4465*, *E.coli 1738*, *P. aeruginosa 123* (определение антибактериальных свойств); *in vivo* – лабораторные животные – морские свинки гладкошерстные (изучение местно-раздражающего действия и стимуляции роста ворса).

В работе при разработке нового состава питательной среды, содержащей гемодериват, использовали в качестве основы и как субстрат сравнения стандартную среду 199 (предприятие по производству бактериальных и вирусных препаратов им. Чумакова, Москва). Контрольными показателями физико-химических свойств питательной среды, содержащей гемодериват, явились количество аминного азота, концентрация хлоридов, рН; биологических свойств – пролиферативная активность по отношению к клеточной линии SPEV. Биологическую активность изучали путем посева клеток в стеклянные флаконы с последующим переносом на свежую питательную среду в течение 5-и пассажей с 3–4-суточным циклом культивирования в термостате при температуре $(36 \pm 1) ^\circ\text{C}$. Для определения индексов пролиферации (ИП) проводили подсчет клеток после каждого пассажа с использованием счетной камеры Горяева. Индекс пролиферации – отношение количества снятых клеток в количеству засеянных. Окончательный учет результатов проводили после 5-го пассажа.

Третья глава посвящена разработке технологии и оценке физико-химических свойств депротеинизированного гемодеривата, выделенного из эритромы крови человека. При разработке технологии гидролиза эритромы осуществляли поиск

оптимального гидролизующего агента среди препаратов очищенных ферментов – трипсина и пепсина. Перед гидролизом эритрому массу разводили в 3 раза для улучшения фермент-субстратного взаимодействия ввиду вязкости исходного продукта. Продолжительность гидролиза составляла 48 часов для каждой серии гидролизата (табл. 1).

Таблица 1

Сравнительная оценка физико-химических показателей исходного сырья и опытных серий ферментативных гидролизатов эритрому массы

Показатель		Номер серии гидролизата				
		1	2	3	4	5
		Трипсин сухой	Трипсин сухой	Трипсина раствор	Пепсин сухой	Пепсин сухой
С фермента, %**		1,00	0,16	0,16	1,00	0,16
рН смеси		7,80±0,20	7,80±0,20	7,80±0,20	1,80±0,20	1,70±0,40
С ам. аз., мг %***	эритрому масса	84,90±1,30	84,90±1,30	84,90±1,30	84,90±1,30	84,90±1,30
	гидролизат	123,20±3,80*	99,40±5,90	105,00±4,90	148,40±5,90*	109,20±3,80

Примечание: * – $p < 0,001$ относительно контроля (аминный азот эритрому массы) по t -критерию Стьюдента; ** – концентрация фермента; *** – концентрация аминного азота.

Установлено, что при создании благоприятных условий гидролиза (для трипсина – щелочная, для пепсина – кислая среда) при аналогичных значениях разведения эритрому массы, концентрации фермента и продолжительности гидролиза результаты отличались. По итогам эксперимента выявлено, что для протеолитического расщепления эритрому массы использование пепсина сухого явилось наиболее оптимальным вариантом. Пепсин обеспечивал более высокий выход аминного азота в конечном гидролизате, чем трипсин ($p < 0,001$). Стадия очистки пепсинового гидролизата эритрому массы характеризовалась меньшими трудностями, чем трипсинового. Учитывали, что использование сухого пепсина экономически выгоднее ввиду более низкой стоимости по сравнению с трипсином (в 8-10 раз ниже). Таким образом, гидролиз эритрому массы в дальнейшем осуществляли пепсином.

После центрифугирования все серии гидролизатов характеризовались большим количеством осадка. Соответственно, степень разведения эритрому массы и концентрация фермента явились условными величинами и в дальнейших испытаниях определяли их оптимальные значения. При разработке технологии гидролиза эритрому массы пепсином применяли методы предварительной обработки исходного сырья:

- гемолиз эритроцитарной массы – разрушение эритроцитов с выходом во внешнюю среду белка гемоглобина – основной мишени гидролиза – для увеличения площади фермент-субстратного взаимодействия;

- высокотемпературная обработка – выдерживание на водяной бане при температуре 90 °С и рН (1,8±0,2) в течение 1 часа – вирусинактивация и частичная денатурация белков эритрому массы.

Обработанную эритрому массу подвергали гидролизу при различных значениях концентрации фермента и продолжительности процесса. Начальная концентрация аминного азота в эритрому массе до процесса гидролиза составляла (70,00±4,90) мг%, рН

(1,8±0,2). Данные параметры контролировали через 24, 72, 144, 168 ч, при этом значение рН доводили до начального уровня (табл. 2).

Таблица 2

Физико-химическая характеристика ферментативных гидролизатов эритро­массы

С фермента, %	Показатель	Продолжительность гидролиза, ч			
		24	72	144	168
2	рН	3,6±0,1	3,6±0,1	3,5±0,1	3,6±0,1
	С ам. аз., мг%	121,8±3,8	133,0±4,9 ^{**}	165,2±3,8 [*]	163,8±3,8
4	рН	3,7±0,1	3,8±0,1	3,7±0,1	3,7±0,1
	С ам. аз., мг%	191,8±6,3	177,8±3,8 ^{***}	204,3±3,2 [*]	208,6±3,1
6	рН	3,8±0,1	3,8±0,1	3,8±0,1	3,8±0,1
	С ам. аз., мг%	250,6±5,9	268,8±3,8 ^{**}	291,2±3,8 [*]	292,6±5,9
8	рН	3,9±0,1	4,0±0,1	4,0±0,1	3,9±0,1
	С ам. аз., мг%	326,2±6,3	319,2±3,8	347,2±3,8 [*]	352,8±3,8
10	рН	4,0±0,1	4,1±0,1	4,0±0,1	4,0±0,1
	С ам. аз., мг%	415,8±3,8	427,0±4,9 ^{***}	459,2±3,8 [*]	459,2±6,3

Примечание. * – $p < 0,001$; ** – $p < 0,01$, *** – $p < 0,05$ (относительно значения концентрации аминного азота после 24 ч гидролиза) по t -критерию Стьюдента.

По результатам, представленным в табл. 2, можно сделать вывод о том, что статистически достоверные различия концентрации аминного азота наблюдались на 144-м ч при любой концентрации фермента. Также можно сказать, что увеличение содержания аминного азота происходит одновременно с повышением концентрации фермента независимо от времени. В связи с этим был проведен контрольный опыт, для которого создали условия псевдогидролиза, предполагающие наличие протеолитического агента и отсутствие субстрата (пепсин без эритро­массы). В табл. 3 представлены данные контрольного опыта, по результатам которого было выявлено, какое количество аминного азота приходилось на долю самого фермента.

Таблица 3

Физико-химическая характеристика образцов контрольного опыта (фермент без субстрата)

С фермента, %	Показатель	Продолжительность гидролиза, ч			
		24	72	144	168
2	рН	2,9±0,1	2,9±0,1	3,0±0,1	3,1±0,1
	С ам. аз., мг%	43,4±3,1	51,8±3,8 [*]	56,0±4,9 ^{**}	60,2±3,8 ^{***}
4	рН	2,9±0,1	2,9±0,1	3,0±0,1	3,2±0,1
	С ам. аз., мг%	67,2±3,8	86,8±3,8 ^{**}	117,6±3,1 ^{***}	116,2±3,8
6	рН	3,0±0,1	3,2±0,1	3,1±0,1	3,2±0,1
	С ам. аз., мг%	75,6±3,1	109,2±3,8 ^{**}	152,6±3,1 ^{***}	160,2±3,8
8	рН	3,3±0,1	3,4±0,1	3,4±0,1	3,4±0,1
	С ам. аз., мг%	96,6±5,9	176,8±6,3 ^{**}	218,4±5,9 ^{***}	224,0±7,0
10	рН	3,5±0,1	3,4±0,1	3,6±0,1	3,7±0,1
	С ам. аз., мг%	144,2±3,8	187,6±3,1 ^{**}	263,2±6,3 ^{***}	261,8±3,8

Примечание. * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$, *** – $p < 0,001$ (относительно значения концентрации аминного азота после 24 ч гидролиза) по t -критерию Стьюдента.

По данным табл. 3 можно сделать вывод о том, что при псевдогидролизе раствора пепсина без белкового субстрата происходит собственное расщепление молекулы фермента на аминокислоты, при этом содержание аминного азота в контрольных образцах, так же, как и в экспериментальных, зависит от концентрации фермента и продолжительности процесса. Для вычисления в образцах гидролизатов количества аминного азота, выделенного собственно эритро массой, с учетом доли аминного азота, приходящейся на фермент, проводили математическое моделирование. Расчет аминного азота собственно эритро массы производили по формуле:

$$C \text{ ам. аз/эр} = C \text{ ам. аз/см} - C \text{ ам. аз/к. пр.}, \text{ где}$$

$C \text{ ам. аз/эр}$ – концентрация аминного азота собственно эритро массы в гидролизованной смеси;

$C \text{ ам. аз/см}$ – общая концентрация аминного азота в гидролизованной смеси (эритро масса и фермент);

$C \text{ ам. аз/к. пр.}$ – концентрация аминного азота в контрольной пробе (без внесения эритро массы).

Данные математических расчетов были приведены к виду ($M \pm m$) путем статистической обработки (табл. 4).

Таблица 4

Математическое моделирование при определении содержания аминного азота собственно эритро массы в гидролизате

С фермента, %	С ам. аз., мг%	Продолжительность гидролиза, ч			
		24	72	144	168
2	В смеси	121,8±3,8	133,0±4,9	165,2±3,8	163,8±3,8
	В контроле	43,4±3,1	51,8±3,8	56,0±4,9	60,2±3,8
	В гидролизате	78,4±0,7	81,2±1,1	109,2±1,1*	103,6±0,0**
4	В смеси	191,8±6,3	177,8±3,8	204,3±3,2	208,6±3,1
	В контроле	67,2±3,8	86,8±3,8	117,6±3,1	116,2±3,8
	В гидролизате	124,6±2,4	91,0±0,0	86,7±0,1*	92,4±0,7
6	В смеси	250,6±5,9	268,8±3,8	291,2±3,8	292,6±5,9
	В контроле	75,6±3,1	109,2±3,8	152,6±3,1	160,2±3,8
	В гидролизате	175,0±2,7	159,6±0,0	138,6±0,7*	132,4±4,1
8	В смеси	326,2±6,3	319,2±3,8	347,2±3,8	352,8±3,8
	В контроле	96,6±5,9	176,8±6,3	218,4±5,9	224,0±7,0
	В гидролизате	229,6±0,4	142,4±2,5	128,8±2,0*	128,8±3,2
10	В смеси	415,8±3,8	427,0±4,9	459,2±3,8	459,2±6,3
	В контроле	144,2±3,8	187,6±3,1	263,2±6,3	261,8±3,8
	В гидролизате	271,6±0,0	239,4±1,8	196,0±2,4*	197,4±2,4

Примечание. *– $p < 0,001$ по сравнению со значением концентрации аминного азота через 24 ч гидролиза; **– $p > 0,05$ по сравнению со значением концентрации аминного азота после 144 ч гидролиза по t -критерию Стьюдента.

Замечено, что при любой концентрации фермента на 144-м часу гидролиза значение концентрации аминного азота достоверно изменяется по сравнению с соответствующим значением после 24 ч гидролиза, но только при концентрации

фермента 2% оно увеличивается во времени (рис. 1). Зависимость количества аминного азота, выделяемого собственно эритро массой от продолжительности гидролиза и концентрации протеолитического фермента, прослеживалась графически (рис. 1).

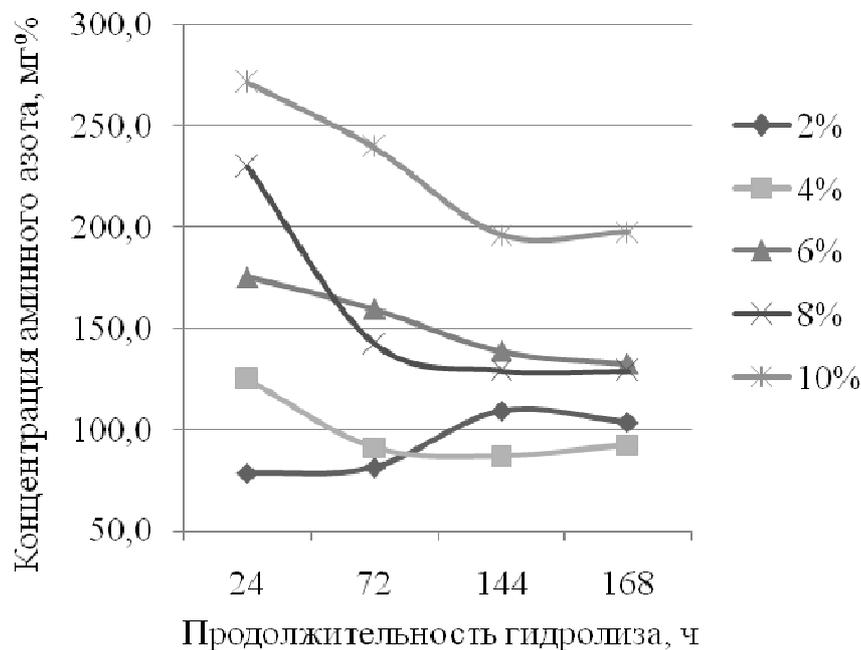


Рис. 1 Зависимость количества аминного азота, выделяемого собственно эритро массой, от продолжительности гидролиза и концентрации фермента

На рис. 1 видно, что наиболее четкая зависимость динамики образования аминного азота с его увеличением во времени прослеживалась при концентрации пепсина 2%. При концентрациях фермента выше 4% значения содержания аминного азота также существенно превышали допустимые концентрации в стандартных питательных средах – (110-113) мг% [Раскин Б.М. и др., 1977]. С учетом данного фактора в дальнейшей работе использовали концентрацию пепсина 2% от объема гидролизуемой смеси. Оптимальная продолжительность проведения гидролиза при данной концентрации – 144 ч, поскольку затем концентрация аминного азота достоверно не увеличивалась.

Полученный по предложенной технологии гидролизат эритро массы имел интенсивную коричнево-бурую окраску. Ввиду этого разработан способ осветления гидролизата с использованием перекиси водорода [Либерман С.Г. и др., 1980]. Для осветления гидролизата эритро массы использовали 15%-ную H_2O_2 в количестве 5,33% от объема осветляемой смеси с последующим центрифугированием и удалением осадка.

Разработан метод получения депротеинизированного гемодеривата эритро массы крови человека путем гидролиза исходного пепсином с конечной концентрацией 2% при рН от 1,6 до 2,0 в течение 144 часов при температуре от 36 до 38 °С. Продукт гидролиза эритро массы – гемодериват – прозрачный, без механических включений, светло-желтый раствор, содержащий 40 мг/мл сухих веществ. Для стабилизации раствора гемодеривата применяли способ лиофильного высушивания.

В данной главе также представлена основная характеристика молекулярных параметров гемодеривата, определяемых методом ВЭЖХ при длине волны 280 нм. На рис. 2 показана хроматограмма гемодеривата.

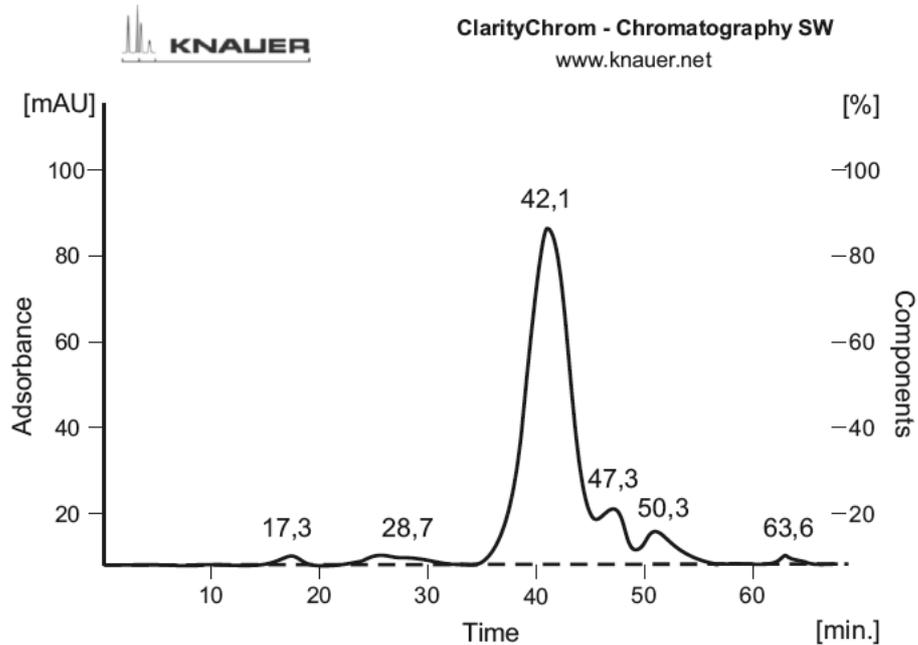


Рис. 2 Хроматограмма депротенизированного гемодеривата эритроцитарной массы крови человека

По результатам хроматографии проводили расчет молекулярных масс идентифицированных пептидных соединений (табл. 5).

Таблица 5

Результаты расчета молекулярных масс пептидов гемодеривата

Номер		Время пика, мин	Kav	Log ₁₀ Mr	Mr, Да	с•10 ⁻³ , %	с, мг/мл
пик	группа						
2	1	28,7	0,313	5,06	115986	0,88	0,04
3	2	42,1	0,687	3,78	6069	328,48	16,42
4	3	47,3	0,832	3,29	1934	24,05	1,20
5	4	50,3	0,915	3,00	1005	14,10	0,71
6	5	63,6	1,295	1,70	50	0,56	0,03

Примечание: Kav – коэффициент доступности пептидов; Mr – молекулярная масса, дальтон; с – концентрация пептидов.

Идентифицированы 5 групп соединений различной молекулярной массы. Вещества 2-й, 3-й и 4-й групп с молекулярной массой от 1000 до 6000 Да имеют наибольшую концентрацию в растворе гемодеривата с преобладанием компонентов 2-й группы (Mr=6000 Да, с=16,42 мг/мл). Концентрация веществ 1-й и 5-й групп наименьшая в гидролизате. Вещество 1-й группы с молекулярной массой 116000 Да, возможно, представляло собой метилцеллюлозу, которая используется в технологии интерферона при начальной обработке лейкоэритроцитарной массы. Вещества последней группы с молекулярной массой 50 Да, предположительно, являлись четырехатомными аминокислотами (аспарагиновой кислотой, треонином).

Гемодериват охарактеризовали как депротенизированный раствор, поскольку он не содержал высокомолекулярных белковых частиц (доказано в реакции с

трихлоруксусной кислотой). Предложенная технология позволяла получать освобожденный от протеолитического агента пепсина раствор гемодеривата. Далее перечислены физико-химические параметры гемодеривата – критерии для определения воспроизводимости технологии (табл. 6).

Таблица 6

Физико-химическая характеристика гемодеривата эритроцитной массы крови человека

Показатель	Значение
рН	3,50±0,20
Концентрация аминного азота, мг%	165,20±3,80
Содержание хлоридов, %	0,33±0,02
Масса сухого остатка, мг/мл	40,00±3,75

Значения параметров (табл. 6) явились допустимыми при последующем получении гемодеривата эритроцитной массы крови человека. Оценивали стабильность физико-химических параметров гемодеривата в процессе хранения в лиофилизированном виде при температуре (6±2) °С. Для исследования готовили растворы гемодеривата с концентрацией 40 мг/мл по сухому веществу с использованием в качестве растворителя воды очищенной. Результаты анализа представлены в табл. 7.

Таблица 7

Исследование стабильности физико-химических показателей гемодеривата в зависимости от срока хранения

Срок хранения, мес.	Значения физико-химических показателей		
	рН	С ам. аз., мг%	Содержание хлоридов, %
0	3,50±0,20	165,20±3,80	0,33±0,02
4	3,60±0,20	163,80±3,80*	0,35±0,02
12	3,60±0,20	168,00±4,90*	0,31±0,04

Примечание: *- $p > 0,05$ по сравнению со значением концентрации аминного азота через 0 мес. хранения по t -критерию Стьюдента.

Как видно из табл. 7, значения физико-химических показателей водных растворов на основе гемодеривата с различными сроками хранения в сухом виде не имеют статистически значимых различий. Таким образом, возможно хранение гемодеривата в лиофилизированном виде при температуре (6±2) °С в течение 12 мес.

Четвертая глава диссертации посвящена исследованиям спектра биологической активности гемодеривата, обуславливающего возможность практического применения его при производстве медицинских иммуно-биологических препаратов.

Оценивали токсичность раствора гемодеривата (40 мг/мл) с применением клеточной линии SPEV. Выявлено, что раствор гемодеривата с разведением в 10 раз средой 199 (4 мг/мл) не оказывал дегенеративного действия на клеточную линию при совместной экспозиции в течение 2 суток. Визуальная оценка качества с помощью

микроскопа с увеличением в 100 раз показала, что клеточный монослой не имел признаков разрушения.

Провели серию экспериментов для определения антибактериальной активности гемодеривата. Изучение противомикробных свойств гемодеривата было основано на результатах интерпретации аминокислотного состава гемодеривата. Выявлено, что природа пептидов, входящих в состав гемодеривата, катионная. Известно, что пептиды катионной природы обладают бактериостатическим действием. Бактерицидные свойства низкомолекулярных пептидов обусловлены их электростатическим взаимодействием с клеточными стенками бактерий [Yount N. Y. et al., 2005; L. Liu et al., 2009]. В качестве биологических моделей использовали бактерии люминесцентного штамма *E.coli Lum+*, а также представителей условно-патогенной флоры.

В первом случае антибактериальную активность по отношению к *E.coli Lum+* исследовали с помощью прибора «Биотокс-10», анализирующего уровень люминесценции бактерий под воздействием различных количеств гемодеривата. Действие регистрировали через 30 минут, далее через 1; 2; 4; 24 ч после внесения образца гемодеривата. Выявлен 100%-ный уровень подавления свечения бактерий при действии на них раствора гемодеривата (40 мг/мл) и его разведений до 100 раз. Свойства растворов гемодеривата 20 мг/мл, отличавшиеся значениями pH соответственно (5,5-6,0) и (6,8-7,4), выраженные в подавлении жизнедеятельности микроорганизмов, сохранялись на всем времени экспозиции при разведениях до 10 раз. При этом низкие концентрации гемодеривата при разведении в 100 раз (0,2 мг/мл) вызывали усиление свечения бактерий до 120%, скорее всего через активизацию метаболических процессов в клетках до полного исчерпания ресурсов микроорганизмов. Во втором случае для оценки действия гемодеривата на условно-патогенную флору был использован раствор с концентрацией, при которой зарегистрированы антибактериальные свойства по отношению к штамму *E.coli Lum+*: 0,2 мг/мл, pH (6,8-7,4). Применяли метод серийных разведений в 10; 20; 40; 80 и 100 раз в жидкой питательной среде. Результаты титрации представлены в табл. 8.

Таблица 8

Оценка антибактериальной активности гемодеривата

Штамм	Характер роста микроорганизмов при концентрации гемодеривата, мг/мл				
	0,02	0,01	0,005	0,0025	0,002
<i>S. epidermidis</i>	-	-	-	+	+
<i>S. aureus</i>	-	-	-	+	+
<i>E.coli</i>	+	+	+	+	+
<i>P. aeruginosa</i>	-	+	+	+	+
<i>Enterococcus</i>	-	+	+	+	+

Примечание: «+» – наблюдали рост, «-» – рост отсутствовал

При оценке результатов титрации по отношению ко всем исследуемым микроорганизмам, кроме *E. coli*, наблюдался антибактериальный эффект. При действии на штаммы *S. epidermidis*, *S. aureus* отсутствие роста наблюдалось при разведении в 40 раз (концентрация гемодеривата 0,005 мг/мл по сухому веществу). В случае со штаммами *Enterococcus*, *P. aeruginosa* антибактериальный эффект замечен

при разведении в 10 раз (концентрация гемодеривата 0,02 мг/мл по сухому веществу). Таким образом, подтверждено наличие антибактериальной активности гемодеривата по отношению к представителям рода стафилококков, в частности, эпидермального и золотистого, энтерококков и синегнойной палочки.

Изучали местно-раздражающее действие гемодеривата при кожных аппликациях *in vivo* с использованием в качестве экспериментальной модели морских свинок гладкошерстных 3-х месячного возраста светлой масти, массой не более 300 г. Применяли спиртовой раствор гемодеривата с концентрацией 20 мг/мл, поскольку при накожных аппликациях он распределялся проще, быстрее испарялся, чем водный. Выявлено, что спиртовой раствор гемодеривата не вызывал покраснения, раздражения и других видимых изменений кожных покровов животных по шкале оценки кожных проб. Наряду с изучаемым свойством было открыто другое – стимуляция роста ворса в зонах аппликаций гемодеривата по сравнению с контрольными зонами (аппликации растворителем – спиртом этиловым 70 %) (табл. 9). Длины ворсинок оценивали с помощью штанген-циркуля на темном фоне (черный картон).

Таблица 9

Анализ влияния раствора гемодеривата на скорость роста ворса морской свинки в зависимости от времени

Продолжительность аппликаций, сут.	Длина ворса, мм	
	Контроль	Раствор гемодеривата
0	0	0
3	2,40±0,27	2,82±0,08
7	4,80±0,40	4,70±0,10
10	6,42±0,41	6,72±0,30*
14	7,00±0,21	9,74±0,29**
18	7,70±0,28	11,02±0,36**
21	8,10±0,23	11,40±0,33
24	9,10±0,34	15,08±0,33
27	10,86±0,26	16,78±0,37
31	13,92±0,31	17,04±0,24

Примечание: * – $p > 0,05$; ** – $p < 0,001$ (относительно контрольного значения длины ворса) по *t*-критерию Стьюдента.

Полученные данные показали, что при использовании спиртового раствора гемодеривата скорость роста ворса у морских свинок увеличивалась по сравнению со скоростью роста на контрольных зонах. Выявлено, что статистически достоверное влияние гемодеривата на скорость роста ворса морских свинок наблюдалось после 14 дней аппликаций. Графически данное явление изображено на рис. 3.

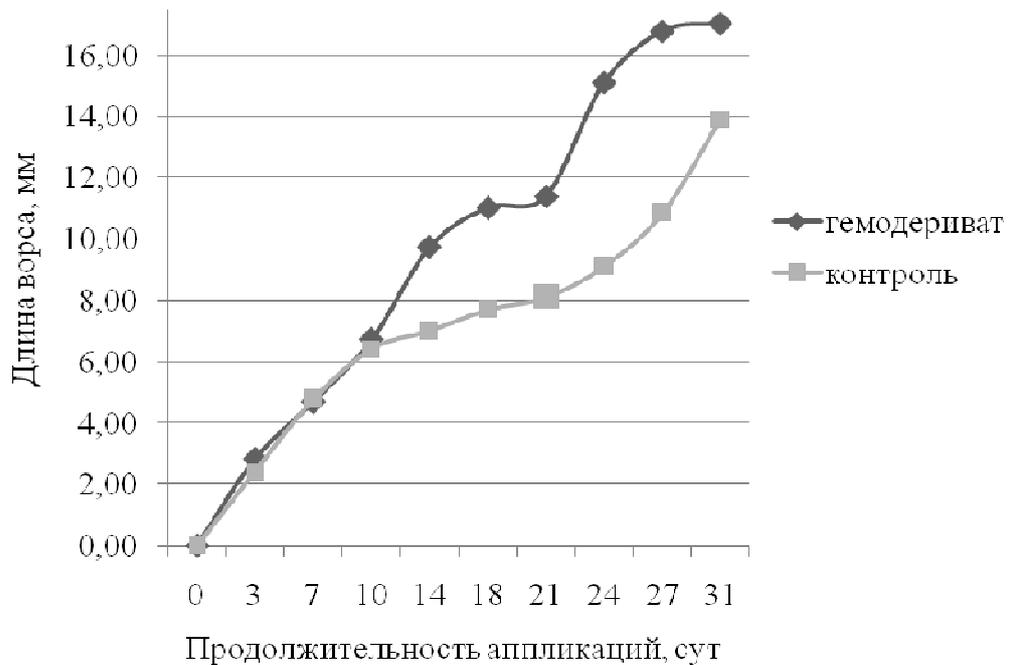


Рис. 3 Графический анализ зависимости длины ворса морской свинки от продолжительности аппликаций.

По результатам анализа данных, представленных на рис. 3, можно сделать вывод, что статистически значимая разница в длинах ворсинок, а, следовательно, увеличение скорости их роста, замечена только после 14 суток воздействия, наибольшая разница – после 21 дня, продолжавшая возрастать до 27-го дня. По истечении этого времени был достигнут максимум длины ворса морских свинок текущего возраста (4 мес.) – 18 мм. Таким образом, эффект спиртового раствора гемодеривата, выраженный в стимуляции скорости роста ворса, наступал после 14 дней ежедневных аппликаций. Кроме того, после 10 дней оценку длины ворсинок можно производить более адекватно.

В главе также представлены материалы, касающиеся оптимизации контроля качества человеческого лейкоцитарного интерферона с использованием перевиваемой клеточной линии SPEV, выращенной на питательной среде с гемодериватом. Разработан вариант питательной среды, содержащей гемодериват, для культивирования клеточной линии SPEV. Состав новой среды конструировали на основе среды 199, стандартно используемой для выращивания клеток SPEV в технологии человеческого лейкоцитарного интерферона, путем частичной замены раствором гемодеривата с концентрацией сухих веществ 20 мг/мл. Установлено, что питательная среда, содержащая среду 199 и раствор гемодеривата (20 мг/мл) в соотношении 5,6:1 обладала улучшенными характеристиками, выявленными по результатам культивирования на ней клеточной линии SPEV. Значения ИП как в исследуемой среде, так и в контроле (среда 199), превышали значения предельно допустимого минимального значения (ИП не менее 4,0). При этом значение ИП на всех пассажах в среде предложенного состава превышало контрольное. Выявлено, что при культивировании клеточной линии SPEV на среде, содержащей гемодериват, количество клеток соответствовало нормативному (снятых клеток было в 4 раза больше, чем засеянных), превышало количество клеток на контрольной питательной среде 199, при этом нарастание адаптированных к измененной по составу среде клеток происходило более интенсивно и плотный монослой наблюдался уже после

первых суток культивирования. При использовании среды с добавлением гемодеривата отмечали эффективное прикрепление клеток к стеклу до суток культивирования (через 15-18 часов), которое приводило к образованию плотного монослоя уже на первые сутки культивирования, в отличие от контроля – среды 199, где монослой образовывался лишь на вторые сутки (через 24-28 часов).

Проведены исследования и сравнительный анализ биологических свойств питательной среды, содержащих гемодериват со сроком хранения 0, 4 и 12 мес. по сравнению с контролем – средой 199. Дано описание характера изменений значений индексов пролиферации клеток на экспериментальной среде с разным сроком хранения по сравнению с контролем (табл. 10).

Таблица 10

Исследование стабильности пролиферативных свойств экспериментальной питательной среды, содержащей гемодериват, в зависимости от срока его хранения в сухом виде

Срок хранения лиофилизированного гемодеривата, мес.		Значение индекса пролиферации, у.е.				
		1П	2П	3П	4П	5П
0	Экспериментальная среда	7,4±0,4	8,0±0,2	8,5±0,5	8,6±0,4	8,7±0,5
4		7,7±0,3	7,5±0,2	8,8±0,3	8,5±0,4	8,3±0,4*
12		6,8±0,3	7,6±0,4	7,6±0,4	7,9±0,2	7,5±0,4**
	Контроль среда 199	6,4±0,4	5,9±0,3	6,8±0,2	6,8±0,2	6,9±0,1***

Примечание: * - $p > 0,05$; ** - $p < 0,05$ (относительно значения ИП при нулевом сроке хранения); *** - $p < 0,05$ (относительно значения ИП при сроке хранения 12 мес.) по t -критерию Стьюдента; П – пассаж.

Индексы пролиферации клеточной линии SPEV не имели тенденции изменяться при культивировании на экспериментальной среде, содержащей гемодериват со сроком хранения до 4 месяцев. Статистически значимое отклонение значений ИП выявлено только при сравнении данных, полученных при использовании среды со сроком хранения 12 и 0 мес – ИП незначительно снижались. При этом существовало статистически значимое различие между значениями ИП на среде, содержащей гемодериват со сроком хранения 12 мес., и контрольной: ИП на первой среде были выше, чем на второй.

Культивирование клеточных линий с целью быстрого наращивания биомассы целесообразно проводить на средах, содержащих гемодериват с любым из исследованных сроком хранения. В производственных условиях среды, содержащие гемодериват, можно рекомендовать для выращивания и поддержания клеточной линии SPEV, поскольку значения индексов пролиферации клеток на них выше, чем на контрольных. В связи с этим эффективность использования сред с гемодериватом будет обоснованной до тех пор, пока значения индексов пролиферации клеток на них будут выше, чем на контрольной среде. Соответственно, допустимо использование питательных сред, содержащих гемодериват со сроком хранения до 12 мес.

Далее проведено испытание, показывающее возможность промышленного использования клеточной линии SPEV, полученной на новой питательной среде, содержащей гемодериват. Клетки линии SPEV выращивали на экспериментальной и на контрольной питательных средах. Полученные клетки использовали в процессе оценки специфической активности интерферона. Выявлено, что результаты определения противовирусной активности интерферона с применением клеточной

линии, полученной на экспериментальной и контрольной питательных средах не имеют статистически значимых различий. Таким образом, вариант питательной среды, содержащей гемодериват, можно рекомендовать для применения в технологии человеческого лейкоцитарного интерферона, а именно на стадии контроля противовирусной активности препарата.

Выводы

1. Разработана технология ферментативного гидролиза эритроцитной массы крови человека для получения гемодеривата. Разработан способ гемолиза сырья для улучшения фермент-субстратного взаимодействия и вирусинактивации. Найдена оптимальная концентрация фермента пепсина, равная 2% от объема гидролизуемой смеси. Определена оптимальная продолжительность гидролиза – 144 ч, обоснованная с точки зрения достижения содержания в гидролизате максимального количества аминного азота и с позиции длительного выдерживания при рН активации фермента от 1,6 до 2,0 для вирусинактивации потенциально опасного в отношении гемотрансмиссивных инфекций сырья – эритроцитной массы крови человека.

2. Оценены физико-химические свойства гемодеривата. Показано, что гемодериват эритроцитной массы крови человека в жидком состоянии представлял собой депротеинизированный раствор с содержанием аминного азота ($165,20 \pm 3,80$) мг%. Состав гемодеривата представлен низкомолекулярными пептидами, масса которых по результатам хроматографии составляла от 1 до 6 кДа. Аминокислотный состав гемодеривата характеризовался наличием 11 заменимых и 7 незаменимых аминокислот. Жидкий гемодериват, полученный по разработанной технологии, содержал 40 мг/мл сухого остатка. В высушенном виде гемодериват представлял собой пористую массу светло-желтого цвета с характерным запахом.

3. Разработан состав питательной среды для культивирования клеточной линии SPEV, содержащей 85% среды 199 и 15% раствора гемодеривата (конечная концентрация в среде 3 мг/мл по сухому веществу). Значения индексов пролиферации на среде нового состава превышали значения предельно допустимого минимального значения (ИП не менее 4,0). При этом индекс пролиферации на всех пассажах клеток в экспериментальной среде превышал значение в контроле ($p < 0,05$).

4. Показана эффективность промышленного использования клеточной линии SPEV, полученной на питательной среде, содержащей гемодериват, при оценке противовирусной активности полуфабриката лейкоцитарного интерферона. В результате было выявлено, что клетки SPEV, выращенные на питательной среде с гемодериватом и на контрольной среде 199, позволяют получать идентичные показатели при определении противовирусной активности интерферона с их использованием.

5. Исследован спектр биологической активности гемодеривата. Антибактериальная активность раствора гемодеривата 20 мг/мл оценена на культуре рекомбинантного светящегося штамма *E.coli lum+*. Подавление жизнедеятельности микроорганизмов сохранялось на всем времени экспозиции при разведениях до 2 мг/мл. При этом низкие концентрации гемодеривата (0,2 мг/мл) вызывали усиление свечения бактерий до 120 %.

Выявлены антибактериальные свойства гемодеривата при действии на культуры условно-патогенных микроорганизмов. При действии на штаммы *S. epidermidis*, *S. aureus* отсутствие роста наблюдалось при концентрации гемодеривата 0,005 мг/мл. В случае со штаммами *Enterococcus* антибактериальный эффект замечен при концентрации гемодеривата 0,02 мг/мл. Рост штамма *P. aeruginosa* наблюдался при концентрации гемодеривата 0,01 мг/мл и ниже.

Показана активность гемодеривата в отношении стимуляции роста ворса на экспериментальной модели морской свинке. Установлено, что аппликации спиртового раствора гемодеривата 20 мг/мл по 50 мкл в сутки увеличивали скорость роста ворса животных по сравнению с контролем (аппликации 70% этиловым спиртом) после 14 дней воздействия, не вызывая при этом кожно-раздражающего действия. По истечении 31 дня был достигнут максимум длины ворса морских свинок текущего возраста (4 мес.) – около 18 мм. Длина ворса после 14 дней аппликаций достигала показателя на 33% больше, чем контрольная длина.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. Волкова, Л. В. Пептидные субстанции на основе эритрогидролизатов / Л. В. Волкова, А. В. Казьянин, Д. Ю. Бузмакова* // XVIII Российский национальный конгресс «Человек и лекарство»: сб. материалов. – Москва, 2011. – С. 500- 501.
2. **Казьянин, А. В. Оптимизация ферментативного гидролиза эритромаcсы для получения пептидной субстанции / А. В. Казьянин, Л. В. Волкова, Д. Ю. Бузмакова // Вестник уральской медицинской академической науки. – Екатеринбург, 2011. – № 3/1. – С. 82.**
3. Получение пептидной субстанции на основе эритрогидролизатов / А. Н. Янкин, Л. В. Волкова, Д. Ю. Бузмакова, А. В. Казьянин // XLIX международная науч. студенч. конф., секция «Биология»: сб. тезисов. – Новосибирск, 2011. – С. 217.
4. **Бузмакова, Д. Ю. Применение протеолиза для биотрансформации белков / Д. Ю. Бузмакова, А. В. Казьянин, Л. В. Волкова // Вестник уральской медицинской академической науки. – Екатеринбург, 2011. – № 4/1. – С. 190-191.**
5. Бузмакова, Д. Ю. Создание лекарственной формы на основе эритрогидролизата / Д. Ю. Бузмакова, А. В. Казьянин, Л. В. Волкова // Актуальные проблемы науки медицинских и фармацевтических вузов: от разработки до коммерциализации : материалы науч.-практ. конференции. – Пермь, 2011. – С. 50- 52.
6. Бузмакова, Д. Ю. Совершенствование метода получения комплекса пептидов на основе побочных продуктов производства препаратов крови / Д. Ю. Бузмакова, А. В. Казьянин, Л. В. Волкова // XIII региональная научно-практическая конференция студентов и молодых ученых «Химия. Экология. Биотехнология- 2011»: сб. тезисов. – Пермь, 2011. – С. 19-21.
7. Бузмакова, Д. Ю. Биологическая активность пула низкомолекулярных пептидов из эритроцитарной массы крови человека / Д. Ю. Бузмакова, А. В. Казьянин, Л. В. Волкова // международная конференция «Биология – наука XXI века»: материалы. – Москва, 2012. – С. 134-136.
8. Бузмакова, Д. Ю. Оценка ростостимулирующих свойств нового полипептидного комплекса / Д. Ю. Бузмакова, А. В. Казьянин, Л. В. Волкова // 50-я юбилейная международная научная студенческая конференция «Студент и научно-технический прогресс»: сб. тезисов. – Новосибирск, 2012. С. 149.

9. Янкин, А. Н. Оценка свойств нового депротеинизированного комплекса / А. Н. Янкин, Д. Ю. Бузмакова, Л. В. Волкова // XIV региональная научно-практическая конференция студентов и молодых ученых «Химия. Экология. Биотехнология-2012»: сб. тезисов. – Пермь, 2012. – С. 62-65.
10. Мальгина, Д. Ю. Стимулятор роста волос : каталог проектов- участников инвестиционного форума Startup Bazaar / Д. Ю. Мальгина. – Новосибирск, 2012. – С. 14-16.
11. Мальгина, Д. Ю. Синтез природного интерферона с использованием эритрогидролизата / Д. Ю. Мальгина, Т. А. Гришина // 17-я международная Пущинская школа-конференция молодых ученых «Биология – наука XXI века»: сб. тезисов. – Пущино, 2013. – С. 354-355.
12. Мальгина, Д. Ю. Оценка антибактериальной активности нового пептидного гемодеривата из эритроцитной массы крови человека / Д. Ю. Мальгина [и др.] // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия [прил. 1]. – Москва, 2013. – Том 15. – №2. – С. 28.
*- Д. Ю. Бузмакова – далее Д. Ю. Мальгина

Мальгина Дарья Юрьевна (Россия)

Разработка технологии гемодеривата из отхода производства интерферона и перспективы его использования

Проведены исследования для выявления биотехнологического потенциала отхода производства человеческого лейкоцитарного интерферона – эритроцитной массы крови доноров. Теоретически и экспериментально обоснована разработанная технология депротеинизированного гемодеривата из эритроцитной массы крови человека, включающая подготовку и ферментативный гидролиз исходного сырья с использованием пепсина. Изучены биологические свойства гемодеривата: антибактериальные, пролиферативные, стимулирующие рост волос. Практическое значение представлял способ получения питательной среды, содержащей гемодериват, для культивирования клеточной линии эпителиальной ткани почки эмбриона свиньи, используемой при оценке противовирусной активности человеческого лейкоцитарного интерферона. Установлен пролиферативный эффект питательной среды, содержащей гемодериват, значения которого превосходили аналогичный показатель на стандартной среде – 199. Подтверждена возможность использования питательной среды, содержащей гемодериват, в технологии интерферона, а именно на стадии контроля его противовирусной активности.

Malgina Darya Yur'evna (Russia)

Gemoderivate technology of the waste by interferon production and using perspectives.

Research to identify biotechnological potential of waste by production of human leukocyte interferon - donors blood erythromass were carried out. Deproteinised erythromass gemoderivat technology of the human blood, including the preparation and enzymatic hydrolysis of the waste with the use of pepsin has been theoretically and experimentally proved. Biological properties of gemoderivate such as antibacterial, proliferative, hair growth stimulating were studied. The preparation method of a culture medium containing gemoderivate for culturing epithelial cell line embryonic kidney pigs used in estimating of the antiviral activity of human leukocyte interferon practical was significance. Established proliferative effect of nutrient medium containing gemoderivate, values above those on the standard medium - 199. Using possibility of nutrient media containing gemoderivate in technology interferon, namely at the stage of its control antiviral activity, was verified.