

## **ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ОБОСНОВАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ПРИГОТОВЛЕНИЯ ПРЕПАРАТА «СТЭМБ»\***

*Аннотация.* Разработана и экспериментально опробована технология получения препарата-иммуномодулятора «СТЭМБ» на основе внеэмбриональных и эмбриональных тканей птиц.

*Ключевые слова:* внеэмбриональные и эмбриональные ткани птиц, иммуномодулятор.

Для современной практической ветеринарной и гуманной медицины важное значение имеет создание иммуномодулирующих средств, применение которых способствует интенсификации лечения и профилактике целого ряда заболеваний и патологических состояний человека и животных, сопровождающихся снижением иммунобиологических свойств организма.

Высокая потребность в препаратах такого назначения предъявляет к ним особые требования. Наряду с направленным воздействием на иммунную систему, желательным эффектом является их влияние на широкий перечень физиологических механизмов и патогенез различных заболеваний. Кроме того, они должны быть сравнительно дешевыми, что особенно важно для ветеринарии. Обеспечение прогнозируемых требований к биостимуляторам полностью зависит от исходного первичного сырья и методов его переработки. Сырье должно быть субстратом живой системы с высоким метаболическим потенциалом. Включать в себя большое количество разнообразных биологически активных веществ, которые не должны противоречить функциональным потребностям живого организма. Сырье должно быть экологически чистым и легко воспроизводимым, в том числе в лабораторно-производственных условиях. Немаловажным является доступность и низкая себестоимость сырья.

Выбор в качестве сырья для приготовления нового препарата «СТЭМБ» инкубационного куриного яйца основан на результате интегративного анализа литературных сообщений, а также экспериментальных данных.

В состав куриного яйца входят вода – 73-74%, сухие вещества – 26-27%. Сухие вещества представлены органическими – 25-26% и неорганическими соединениями – 0,6-0,8%, в том числе 12-13% протеинов, 11-12% жиров, 0,8-1,2% углеводов. Протеины богаты аминокислотами. В яйце содержатся витамины группы В, Н, РР, А, D, Е и каротиноиды. В состав липидов входят глицериды, фосфолипиды, стеролы и цереброзиды. Разнообразен состав неорганических соединений: сера, калий, натрий, хлор, фосфор, кальций, магний, железо, медь, йод, марганец, цинк, кремний [2]. Между внеэмбриональными и эмбриональными тканями инкубируемого яйца постоянно происходит перераспределение химических веществ, которые в процессе инкубирования все больше перераспределяются в сторону эмбриональных тканей, при этом происходит их полимеризация и встраивание в клеточные структуры. Причем в результате развития эмбриона происходит как перераспределение различных биологически активных веществ между тканями, так и образуются новые биологически активные вещества.

С началом развития эмбриона в яйце протекают обменные процессы, в основе кото-

\* © Ржепаковский И.В., Тимченко Л.Д., Вакулин В.Н., Ржепаковский В.В.

рых лежат разнообразные химические реакции, катализируемые ферментами. Например, глюкоза в яйце содержится в свободном виде и связана с белком – овомукоидом. При взаимодействии овомукоида с ферментом мукоидазой, которая находится в тканях эмбриона, происходит отщепление глюкозы. В неоплодотворенном яйце обмен углеводов, белков и липидов вообще не происходит. На третий день инкубации в оплодотворенном яйце в результате белкового обмена в желтке обнаруживается много свободных аминокислот, в белке куриного яйца наибольшее количество аминокислот отмечено на 7 день, а на 9 день инкубации отмечается максимальное количество аминокислот и пуриновых оснований в теле зародыша [8]. Таким образом, тканям развивающегося эмбриона присуща высокая метаболическая активность происходящих процессов, а значит – и активность роста.

В процессе эксперимента подтверждено, что наиболее целесообразно использовать в качестве субстрата для приготовления препарата иммуномодулятора инкубированное яйцо на 9-10 сутки инкубации, когда полноценно используются как ткани развивающегося куриного эмбриона, так и остаточная масса внеэмбриональных тканей, которые имеют высокий потенциал роста и в высшей степени богаты белком.

Несмотря на высокий потенциал биологической активности тканей инкубированного до 9-10 суток куриного яйца, результаты экспериментальных исследований свидетельствуют о существующей нестандартности получаемых субстратов от различных эмбрионов, что усложняет процесс получения стандартизованного препарата.

Для решения этой проблемы, а также с целью повышения метаболической активности в тканях эмбриона с целью получения высокоэффективного биостимулятора и достижения его превосходства по сравнению с аналогами, нами использован дополнительный метод технологической обработки, направленный на биологическую стимуляцию тканей эмбриона и на оптимизацию всех физиологических показателей к сроку использования получаемого субстрата в качестве составной части препарата. С этой целью нами использовано облучение инкубируемых яиц с помощью лазерного аппарата.

Лазер или оптический квантовый генератор – это техническое устройство, испускающее свет в узком спектральном диапазоне в виде направленного сфокусированного, высококогерентного монохроматического, поляризованного пучка электромагнитных волн. Термин «лазер» («laser») составлен из начальных букв пяти слов «Light amplification by stimulated emission of radiation», что в переводе с английского означает «Усиление света путем его вынужденного излучения». В сущности, лазер представляет собой источник света, в котором путем внешнего освещения достигается возбуждение атомов определенного вещества. И когда эти атомы под воздействием внешнего электромагнитного излучения возвращаются в исходное состояние, происходит вынужденное излучение света [10].

Низкоэнергетическое лазерное излучение применялось для активизации развития зародыша птицы при инкубации еще в 70-е годы XX века. Комплексное воздействие лазерного излучения на эмбриональное и дальнейшее развитие птицы детально изучены. Однако использование полученных результатов в промышленном птицеводстве сдерживается отсутствием технологии и серийных установок для лазерной обработки инкубационных яиц [3].

В связи с этим Н.Л. Лисиченко с соавт. в 2003 г. провели испытание полуавтоматической установки лазерного облучения в реальных условиях промышленного инкубатора и подтвердили ее эффективность: уровень выводимости молодняка повышается на 5-20% в зависимости от вида птицы (куры, утки, гуси); синхронность вывода удается довести до 80-85%, а в отдельных партиях – и до 90% [4]. Именно последний факт позволяет рассчитывать на то, что использование лазера даст возможность стандартизации тканевых субстратов, полученных от различных куриных эмбрионов.

Обработка инкубационных яиц излучением оказывает положительное влияние как на эмбриональное, так и на раннее постэмбриональное развитие птицы: приводит к достоверному снижению гибели эмбрионов на ранних стадиях развития, гибель зародышей в первые 48 часов инкубации уменьшается в 2 раза [1].

Обобщая данные современных исследований, можно сказать, что низкоинтенсивное лазерное излучение вызывает повышение активности важнейших ферментов, снижение потребления кислорода тканями с повышением фосфорилирующей активности митохондрий, обогащением их энергией, усиление интенсивности гликолиза (образования гликогена) в тканях и другие. Вторичные эффекты представляют собой комплекс адаптационных и компенсаторных реакций, возникающих в результате реализации первичных эффектов в тканях, органах и целостном живом организме. Таким образом, в основе механизма воздействия на ткани маломощных лазеров в видимой и инфракрасной областях лежат процессы, происходящие на клеточном и молекулярном уровнях [6].

В связи с вышеизложенным в работе мы использовали полупроводниковый низкочастотный лазерный аппарат АЛ-01 «Семикон», применяемый в медицине для улучшения регенерации и кровоснабжения поврежденных участков кожи. Взятые при этом параметры облучения были рекомендованы наставлением по применению этого аппарата, а также экспериментально отработаны в процессе поиска оптимальной дозы облучения [7]. Сроки и кратность оптимального воздействия на инкубируемые яйца также выявляли в процессе эксперимента. Для этого использовали 30 куриных яиц, которые делили на 3 группы по 10 штук в каждой. При этом учитывали массу эмбрионов, средний размер долек тимуса, лизоцимную активность и уровень развития кровеносных сосудов желточного мешка. В первой группе яйца не облучали и исследовали на 9-10 сутки инкубации, яйца второй группы облучали на 5 и 7 сутки инкубации, а в третьей группе – на 5, 6, 7 сутки инкубации. В результате исследований установлено, что масса эмбрионов, облученных на 5 и 7 сутки инкубации, была больше, чем у необлученных, на 25,8% (при  $P < 0,01$ ), а у облученных на 5, 6, 7 сутки – на 48,4% (при  $P < 0,001$ ). Средний размер долек тимуса у эмбрионов, облученных на 5, 7 сутки, был больше, чем у необлученных, на 41,5% (при  $P < 0,01$ ), а у облученных на 5, 6, 7 сутки – на 72,4% (при  $P < 0,001$ ). Объем желтка и белка изменялись недостоверно. Лизоцимная активность в яйцах, облученных на 5 и 7 сутки, была выше на 6,3% (при  $P < 0,01$ ), а в яйцах, облученных на 5, 6, 7 сутки – на 11,7% больше (при  $P < 0,001$ ), чем у необлученных. При облучении яиц сосудистая сеть вокруг желточного мешка была развита значительно интенсивнее. Исследование массы эмбрионов, кровеносных сосудов желточного мешка, а также гистологическое исследование тимуса подтвердили наибольшую стимуляцию роста внеэмбриональных и эмбриональных тканей, в том числе иммунных органов при облучении инкубируемых яиц с помощью лазерного аппарата АЛ-01 «Семикон» на 5, 6, 7 сутки инкубации и взятых на 9-10 сутки.

Следующие стадии технологической схемы получения препарата соответствовали технологии получения тканевых препаратов и состояли из помещения эмбрионов в холодильную камеру, их гомогенизации, фильтрации субстрата, разбавления и консервирования. Тканевые препараты зарекомендовали себя как наиболее эффективные и универсальные иммуностимулирующие средства. Они действуют благотворно в основном на те органы, из которых они изготовлены. Другие соединения действуют опосредованно через усиление или коррекцию обмена веществ в отдельных органах или в организме в целом. Причем действие каждого из биостимуляторов определяется тем или иным специфическим биологическим соединением или их комплексом, являющимся действующим началом [5; 9].

Большинство технологий получения тканевых препаратов включают в себя стадию

---

---

помещения субстрата в холодильную камеру на 4 или 10 суток, что, по нашему мнению, не всегда выгодно изменяет прогнозируемые качественные и количественные характеристики получаемых препаратов. Напротив, помещение инкубированного яйца в холодильную камеру на 7 суток при температуре 2...4°C способствует не только достаточному выделению биогенных стимуляторов, но и сохранению ряда бактерицидных компонентов, в частности, лизоцима. Важным фактором, на наш взгляд, является тот факт, что эмбриональные ткани находятся все это время под скорлупой, что дает возможность предполагать сохранение стерильности и минимальные потери ценных свойств субстрата, которые, несомненно, происходят при изготовлении других препаратов.

Последующие этапы обработки направлены на достижение максимальной дисперсности и высокой растворимости препарата, что достигается путем тщательного измельчения эмбриона и всех внеэмбриональных тканей в гомогенизаторе при 8000 об./мин. в течение 5 минут и фильтрации с последующим разбавлением 0,9% раствором натрия хлорида не менее, чем 1:10. Это позволяет получить препарат, имеющий высокую степень сродства с тканями организма и легко всасывающийся в кровь без проявления каких-либо осложнений.

Важнейшим этапом технологической обработки является обеспечение стабилизации химической структуры препарата и его стерильности. Для этого нами использовался формалин, который обладает эффективным бактерицидным и консервирующим действием и целесообразен при изготовлении больших объемов препарата. Количество консерванта в препарате минимально около 0,3% и соответствует всем стандартам, используемым на фармацевтических производствах. После фасовки препарат помещали в термальную камеру при температуре 37°C на 7 суток для более эффективного действия формалина.

Использование формалина позволило нам избежать традиционно применяемого жесткого метода стерилизации – автоклавирования с сохранением большинства химических компонентов препарата: белков, аминокислот, органических кислот и витаминов. При этом количество белка в препарате «СТЭМБ» составило 6,5%, аминокислот – 1,82%. Причем в препарате содержатся в большом количестве аминокислоты, участвующие в стимуляции иммунных процессов в организме – аспарагиновая и глутаминовая. В течение двух лет хранения химический состав и стерильность препарата оставались стабильными, что также подтверждает правильность выбора консерванта.

Тенденция к уменьшению количества белка до 5,7%, а аминокислот до 1,28%, была установлена после хранения препарата при температуре 2...8°C в течение трех лет. При этом сохранялась полная микробиологическая стерильность.

Иммуномодулирующая эффективность препарата «СТЭМБ» была подтверждена результатами, полученными при использовании его новорожденным ягнтям с признаками иммунодефицита. При этом под влиянием препарата происходит достоверное увеличение прироста живой массы, количества эритроцитов, лейкоцитов и содержания гемоглобина. Увеличивалось содержание Ig A, Ig G, при одновременном снижении Ig M. Количество Т-, В-, D-, 0-лимфоцитов и группы Т-киллеры, Т-супрессоры достоверно увеличивалось, при недостоверном уменьшении количества Т-хелперов. Отмечено повышение бактерицидной, лизоцимной и фагоцитарной активности. При исследовании влияния препарата «СТЭМБ» на иммунокомпетентные органы и печень установлено: увеличение площади долек тимуса, числа телец Гассала, площади белой пульпы селезенки, количества фолликулов в лимфатических узлах и усиление регенераторной активности печени. При этом повышение или понижение всех исследованных показателей происходило в рамках предельных значений нормы, что свидетельствует об иммуномодулирующем эффекте полученного препарата.

Таким образом, ключевыми технологическими приемами, обуславливающими, по нашему мнению, преимущество препарата «СТЭМБ» над другими аналогами, можно считать использование высоко биологически активного сырья – эмбриональных и внеэмбриональных тканей кур на 9-10 сутки развития, применение лазерного облучения на 5, 6, 7 сутки инкубации, помещение инкубированного таким образом яйца в холодильную камеру на 7 суток при температуре 2...4°C, использование эффективных методов достижения дисперсности и высокой растворимости препарата и щадящих методов консервации.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ:

1. Бецкий О.В. Миллиметровые волны и живые системы / О.В. Бецкий, В.В. Кислов, Н.Н. Лебедева. – М.: САЙНС-ПРЕСС, 2004.
2. Буртов Ю.З. Эмбриональное развитие / Ю.З. Буртов // Инкубация яиц: Справочник. – М., 1990. – С. 31-48.
3. Инюшин В.М. Лазерный свет и живой организм / В.М. Инюшин. – Алма-Ата, 1970.
4. Лисиченко, Н.Л. Полуавтоматическая установка для лазерной обработки инкубационных яиц / Н.Л. Лисиченко, В.А. Коробов, Ю.Ф. Игнуташа // Материалы XIX международной научно-практической конференции «Применение лазеров в медицине и биологии». – Киев, 2003.
5. Мозгов И.Е. Фармакология: Руководство для ветеринарных врачей / И.Е. Мозгов. – М.: Сельхозгиз, 1961.
6. Петров Е.Б. Сравнительное изучение прединкубационного действия когерентного (лазера) и некогерентного (лампа накаливания) источников света на эмбриогенез и резистентность выведенных цыплят / Е.Б. Петров // Повышение естественной резистентности сельскохозяйственной птицы: Сб. научн. тр. / МВА. – М., 1983. – С. 48-52.
7. Применение лазерного аппарата АЛ-01 «Семикон»: Методические разработки. – Самара: СМИ, 1993.
8. Третьяков Н.П. Инкубация с основами эмбриологии / Н.П. Третьяков, Б.Ф. Бессарабов, С.Г. Крок. – М.: Агропромиздат, 1990.
9. Филатов В.П. Тканевая терапия / В.П. Филатов. – М.: Знание, 1955.
10. Электроника: Энциклопедический словарь. – М.: Сов. энциклопедия, 1991.

I. Rzhepakovsky, L. Timchenko, V. Vakulin, V. Rzhepakovsky  
EXPERIMENTAL SUBSTANTIATION OF TECHNOLOGY OF PREPARATION OF  
PREPARATION «STEMB»

*Abstract.* The technology of reception of preparation – immunomodulating factor «STEMB» is developed and experimentally tested on a basis external embryonal and embryonal tissues of birds.

*Key words:* external embryonal and embryonal tissues of birds, the immunomodulating factor.