

971  
**РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ НАУК  
ДАЛЬНЕВОСТОЧНОЕ ОТДЕЛЕНИЕ  
ТИХООКЕАНСКИЙ ИНСТИТУТ БИООРГАНИЧЕСКОЙ ХИМИИ**

На правах рукописи

ЛОЕНКО Юрий Николаевич

**БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ И МЕХАНИЗМ  
ДЕЙСТВИЯ БИОПОЛИМЕРОВ  
ИЗ МОРСКИХ ОРГАНИЗМОВ**

03.00.04 - биохимия

Автореферат  
диссертации на соискание ученой  
степени доктора биологических наук

Владивосток - 1999 г

Работа выполнена в Тихоокеанском институте биоорганической химии  
Дальневосточного отделения РАН.

**Официальные оппоненты:** доктор биологических наук,  
профессор **Костецкий Э.Я.**  
доктор биологических наук,  
профессор **Эпштейн Л.М.**  
доктор биологических наук  
**Кушнерова Н.Ф.**

**Ведущая организация:** Биолого-почвенный институт ДВО РАН.

Защита состоится 22 " июня 1999 г. в "10" часов на заседании

Диссертационного Совета Д.003.99.01 по защите диссертаций в  
Тихоокеанском институте биоорганической химии ДВО РАН по адресу:  
690022, г. Владивосток, проспект

С диссертацией можно  
библиотеке ДВО РАН (Владивосток,  
ДВГИ).

Автореферат разослан "20"

Ученый секретарь  
Диссертационного совета  
кандидат химических наук  
старший научный сотрудник

972

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**АКТУАЛЬНОСТЬ ИССЛЕДОВАНИЯ.** Среди возобновляемых биохимических ресурсов Мирового океана некоторые группы растительных и животных организмов более чем другие распространены или доминируют на больших территориях, что составляет предмет особого интереса со стороны химиков и биохимиков, исследующих возможности выделения биологически активных веществ, а также пути и способы создания на их основе новых лекарственных средств. К таким группам организмов нужно отнести прежде всего некоторые виды морских водорослей (*Algae*) и морских цветковых растений - морские травы (сем. *Zosteraceae*), такие виды донных животных организмов, как двустворчатые моллюски (*Bivalvia*), иглокожие (*Echinodermata*), губки (*Porifera*) и др. Успехи в развитии морской биотехнологии и ее основы - химии морских природных соединений - могут быть достигнуты только при фундаментальном изучении биологии и биохимии морских организмов, а также разностороннем исследовании биологической активности их структурных компонентов, метаболитов и других биохимических соединений. В ряду морских природных соединений несомненный интерес представляют группы биополимеров, составляющих структурную основу живых организмов и участвующих практически во всех процессах их жизнедеятельности. К таковым относятся белки, нуклеиновые кислоты, полисахариды и смешанные биополимеры - гликопротеиды, липопротеиды, протеогликианы и т.д. В последние годы отмечено достаточно большое количество публикаций, посвященных изучению полезных свойств морских биополимеров. Очевидно, этому процессу способствуют возросшие возможности технологий быстрого разделения и очистки высокомолекулярных компонентов. Исследование морских биополимеров в качестве биологически активных веществ представляет интерес со многих точек зрения. Можно выделить три наиболее актуальные и интересные направления исследований в этой области: 1) изучение спектра биологической активности индивидуальных морских биополимеров, включая выяснение их биохимической роли в организме продуцента; 2) изучение тропности и механизма биологического действия морских биополимеров; 3) разработка новых биохимических препаратов и фармацевтических средств на основе морских биополимеров.

**ЦЕЛЬ РАБОТЫ** - детальное исследование биологической активности и механизма действия индивидуальных биополимеров морских организмов (митилан, кораллан, фукоидан, уронофукан, хитоолигосахариды, зостерин); изучение возможностей применения морских биополимеров в комбинации с известными лекарственными средствами для достижения аддитивного эффекта; биохимическая характеристика эндогенных лектинов мидии Японского моря *Crenomytilus grayanus*; определение функциональной роли лектинов мидии *C. grayanus* в организме-продуцента; изучение сорбционных и антидотных свойств углеводного биополимера зостерина в условиях эксперимента и клинических испытаний при угрозе свинцовой интоксикации у людей, а также экспериментальное оптимизирование его антидотных свойств; разработка комбинированных зостеринсодержащих парафармацевтических средств.

**НАУЧНАЯ НОВИЗНА РАБОТЫ.** Впервые подробно изучена биологическая активность и механизм действия ряда морских биополимеров животного и растительного происхождения. Показана перспективность исследования комбинированных форм морских биополимеров и известных лекарственных средств. Установлено, что спектр биологической активности сложного высокомолекулярного комплекса - митилана зависит от индивидуального и совокупного вклада отдельных его компонентов: белковой и полисахаридной природы. Получены данные о локализации и функциональной роли лектинов (Л-1 и Л-2) в организме-продуценте мидии *C. grayanus*). Определена углеводная

№ \_\_\_\_\_

(для Л<sub>1</sub> и Л<sub>2</sub>) и молекулярно-эпитопная (для Л-1) специфичность лектинов. Экспериментально доказано, что модификация сульфатированного протеогликана кораллана приводит к повышению его биодоступности и оптимизации целевого эффекта. С учетом особенностей химической структуры и механизма действия уронофукана сделан вывод о перспективности поиска аналогичных соединений среди морских организмов, действующих по принципу блокирования в системе: вирус→мишень. Исследованы сорбционные и антидотные свойства зостерина, позволившие рекомендовать его в качестве профилактического и лечебного средства при избыточном поступлении и накоплении в организме тяжелых металлов. Изучена фармакокинетика меченого <sup>3</sup>H-зостерина, где с учетом молекулярно-массового распределения сделан вывод о его двунаправленном антидотном действии: энтеросорбционном и гуморальносорбционном. Исследования по изучению контактного взаимодействия зостерина и пищеварительных ферментов позволяют прогнозировать отсутствие или наличие негативных побочных эффектов при длительном применении зостерина в качестве элемента выделительной терапии. Осуществлены новые подходы к использованию зостерина в различных комбинациях с лекарственными растениями, в том числе с реликтами Дальневосточной флоры.

**НА ЗАЩИТУ ВНОСЯТСЯ СЛЕДУЮЩИЕ ПОЛОЖЕНИЯ:** 1. Морские биополимеры выступают как многофункциональные биологически активные вещества, где наряду с основным направлением действия (например, противоопухолевым; иммуномодулирующим; детоксикационным; антивирусным; антибактериальным и т.д.) отмечаются и другие, сопряженные с основным, положительные эффекты; 2. Морские биополимеры представляют интерес, по крайней мере, в трех номинациях: лекарственные средства; биохимические препараты; биологически активные добавки (БАД).

**ПРАКТИЧЕСКАЯ ЦЕННОСТЬ.** Выявлены морские организмы как источники новых высокоактивных биополимеров. Результаты исследований по изучению биологической активности и механизма действия биополимеров позволяют вести целенаправленный отбор аналогичных соединений среди морских организмов животного и растительного происхождения. ТИБОХ ДВО РАН совместно с Российским НИИ синтетических и натуральных душистых веществ предложен и рекомендован к промышленному выпуску ряд биологически активных кремов, содержащих митилан. Всесторонний анализ полезных свойств лектинов мидии *S. grayanus* с целью их практического применения показал, что Л-1 и Л-2 лектины являются перспективными биохимическими препаратами: Л-1, обладая преципитирующими свойствами по отношению к α<sub>1</sub>-кислоту гликопротеину (белок острой фазы воспаления) и раковоэмбриональному антигену (РЭА), может быть использован при диагностике воспалительных процессов и злокачественных новообразований; Л-2, образуя на поверхности агарозных микроносителей адгезивно-белковый слой, может быть использован для культивирования поверхностно-зависимых клеток. Противоопухолевый иммуномодулятор - кораллан - в настоящее время завершает клиническую апробацию в Национальном институте онкологии и радиологии (Гавана, Куба). Углеводный биополимер зостерин нашел применение в качестве эффективного энтеросорбента, используемого при заболеваниях, требующих уменьшения метаболической нагрузки на органы детоксикации и экскреции, а также в качестве средства, улучшающего состояние гуморальной среды, иммунного статуса и других физиологических систем организма.

На основании результатов, полученных ТИБОХ ДВО РАН, Федеральным управлением медико-биологических и экстремальных проблем при Минздраве России оформлены и утверждены "Методические указания по применению зостерина в лечебно-профилактическом питании на свинцово-цинковых производствах и предприятиях

поливалентных металлов" (Москва, 1995 г.). ОАО "Владивостокская фармацевтическая фабрика" выпущена опытная партия лечебно-профилактической пищевой добавки "Гербамарин" (таблетированная форма). ОАО "Уссурийский бальзам" (г.Уссурийск) выпускает на постоянной основе лечебно-профилактическую пищевую добавку (сиропный бальзам) - "Гербамарин". Все вышеперечисленные разработки защищены патентами Российской Федерации.

**АПРОБАЦИЯ РАБОТЫ.** Материалы работы были представлены на 7-ой Всесоюзной конференции "Химия и биохимия углеводов" (Пушино, 1982); на 2-ом Европейском симпозиуме по карбогидратам и гликоконъюгатам (Будапешт, 1983); на Всесоюзном симпозиуме "Структура, биосинтез и функции молекулярных элементов иммунной системы" (Пушино, 1987); на Всесоюзном семинаре "Проблемы производства продукции из красных и бурых водорослей" (Владивосток, 1987); на Всесоюзном совещании "Актуальные проблемы иммунологии: иммунодефициты, иммунокоррекция" (Владивосток, 1987); на 5-ой Всесоюзной конференции по методам получения и анализа реактивов (Рига, 1987); на 10-й, 11-ой, 12-ой и 13-ой Международных конференциях по лектинам (Прага, 1988; Тарту, 1989; Калифорния, 1990; Берлин, 1991); на Всесоюзном совещании "Биологически активные вещества гидробионтов при комплексной утилизации ресурсов Океана" (Владивосток, 1988); на 6-ом Международном симпозиуме по морским природным продуктам (Дакар, Сенегал, 1989); на конференции "Перспективы развития малотоннажной химии" (Красноярск, 1989); на 4-ой Всесоюзной конференции "Химия, фармакология и механизмы действия противолучевых средств" (Москва, 1989); на Всесоюзной конференции "Химия пищевых веществ. Свойства и использование биополимеров в пищевых продуктах" (Могилев, 1990); на Всесоюзном совещании "Биологически активные вещества гидробионтов - новые лекарственные, лечебно-профилактические и технические препараты" (Владивосток, 1991); на Международном симпозиуме "Клиническая гипертерапия, активация, иммуномодуляция и радиосенсибилизация при опухолях" (Владивосток, 1992); на Межгосударственной научной конференции "Комплексная переработка пищевого сырья и основные направления расширения ассортиментов продуктов питания (Владивосток, 1993); на 8-ой Международной конференции "Химические модификаторы при опухолевой терапии (Киото, Япония, 1993); на Региональной ассамблее "Здоровье населения Дальнего Востока" (Владивосток, 1996); на втором съезде Биохимического общества РАН (Пушино, 1997); на первом Международном тихоокеанском конгрессе по традиционной медицине (Владивосток, 1998); на Российской научной конференции "Новые биомедицинские технологии с использованием биологически активных добавок" (Владивосток, 1998).

**ПУБЛИКАЦИИ.** По теме диссертации опубликовано 29 статей, 3 обзора, 11 тезисов докладов, 1 монография, получено 12 патентов.

**СТРУКТУРА И ОБЪЕМ.** Диссертация состоит из введения, 5 глав, заключения, выводов и списка цитированной литературы. Работа изложена на 211 страницах, куда входят 37 рисунков и 64 таблицы (в экспериментальной части).

Автор выражает свою искреннюю признательность директору ТИБОХ ДВО РАН, Председателю ДВО РАН, Вице-президенту РАН академику Г.Б.Елякову за всестороннюю поддержку исследований. Автор благодарит за помощь и участие в работе сотрудников лаборатории химии неинфекционного иммунитета, биотехнологии, морской микробиологии, коллег из других лабораторий ТИБОХ.

## СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В качестве биологических моделей были использованы следующие микроорганизмы: *Salmonella typhimurium* (штамм CS-48), *Escherichia coli* (штамм 93), *Yersinia pseudotuberculosis* (штамм 1179), *Staphylococcus aureus* (штамм Гуре), *Pseudomonas aeruginosa* (штамм 606), *Salmonella enteritidis* (штамм 45) из музея НИИ эпидемиологии и микробиологии Сибирского отделения РАМН, а также морские бактерии, ассоциированные с мидией *Crenomytilus grayanus* - *Photobacterium sp.*, *Flavobacterium sp.*, *Pseudomonas sp.* из музея ТИБОХ ДВО РАН.

Изучение механизма противовирусной активности биополимеров осуществляли на моделях: вирус иммунодефицита человека I типа, вирус лейкоза Раушера, вирусы полиомиелита - 2 тип, Коксаки А7, Коксаки В2, аденовирус - 7-й тип.

При исследовании противоопухолевой активности были использованы следующие опухолевые штаммы мышей: лимфоидная лейкемия (L1210), карцинома легких (штамм Льюис) LLC, аденокарцинома молочной железы 755 (АК 755), меланома В16 (мел.В16), аденокарцинома толстой кишки (АКАТОЛ), солидные и асцитные варианты саркомы 37 и карциномы Эрлиха (тетраплоидный штамм). Все перечисленные штаммы получены из ВОНЦ АМН СССР (г.Москва), клетки карциномы Эрлиха, адаптированные для размножения *in vitro* - из Института по изысканию новых антибиотиков АМН СССР (г.Москва).

Эксперименты проводились на белых беспородных мышах, линейных C57BL/6, DBA/2, CBA, C3H, BALB/C и мышцах-гибридах BDF (C57BL x DBA/2). В специальных исследованиях использовались такие лабораторные животные как крысы, кролики и морские свинки.

Сборы и заготовка морского биологического сырья осуществлялись на Морской экспериментальной станции ТИБОХ ДВО РАН, расположенной в бухте Троица залива Посыет Японского моря (Хасанский район Приморского края) и на Кубе (экспедиционные рейсы). Методы выделения и установления химической структуры разработаны и выполнены сотрудниками ТИБОХ ДВО РАН.

Для получения митилана в качестве исходного сырья использовали мантию свежеевыловленной мидии Японского моря *Crenomytilus grayanus*.

По аналитическим данным митилан состоит из полисахаридного и белкового компонентов (таблица 1), которые связаны прочной, но не ковалентной связью. Молекулярная масса митилана составляет около 3 МДа.

Таблица 1.

Состав сырого экстракта и митилана

Образец	Углеводы,%	Белок,%	Нуклеиновые кислоты,%	Зола,%
Сырой экстракт	60	25	1,5	10
Митилан	95	5	-	-

Установлено, что полисахаридный компонент митилана является гликогеноподобным  $\alpha$ -1,4;1,6-D-глюканом, содержащим небольшое число  $\alpha$ -1,2 и  $\alpha$ -1,3-

глюкозидных связей в точках разветвления и отличающимся более высокой степенью разветвленности.

В состав белкового компонента митилана по данным ДСН-электрофореза входит несколько белков с молекулярными массами 14,5; 18,0; 32,7; 45,0; 68,0 кДа, из которых количественно преобладает полипептид с молекулярной массой 18,0 кДа. Среди белков выявлены два белка-лектина (Л-1 и Л-2), способные агглютинировать эритроциты и опухолевые клетки. Лектин Л-1 гомогенен по данным ДСН-электрофореза, он имеет одну полосу, соответствующую молекулярной массе 18,0 кДа. Л-2 обнаруживает в ДСН-электрофорезе три зоны, соответствующие молекулярным массам 12,0; 14,5; 18,0 кДа, причем количественно преобладает полипептид - 18,0 кДа. Аминокислотный состав Л-1 и Л-2 характеризуется высоким содержанием полярных аминокислот и отсутствием цистеина (таблица 2).

Таблица 2.

Аминокислотный состав Л-1 и Л-2 (мол.%)

Аминокислота	Л-1	Л-2	Аминокислота	Л-1	Л-2
<b>Асп</b>	6,5	8,1	<b>Мет</b>	0,6	-
<b>Тре</b>	1,3	1,9	<b>Изолей</b>	0,6	1,0
<b>Сер</b>	1,8	1,8	<b>Лей</b>	1,2	1,9
<b>Глу</b>	2,7	4,3	<b>Тир</b>	1,2	1,2
<b>Про</b>	2,0	3,0	<b>Фен</b>	2,1	2,1
<b>Гли</b>	6,2	2,5	<b>Лиз</b>	3,1	3,6
<b>Ала</b>	2,0	2,5	<b>Гис</b>	2,5	3,5
<b>Вал</b>	1,0	1,5	<b>Арг</b>	1,3	2,1

Отличительной особенностью лектинов Л-1 и Л-2 является их термостабильность. Л-1 сохраняет агглютинирующую активность при нагревании раствора лектина до температуры 55-60°C. По сравнению с Л-1, Л-2 является более устойчивым к действию высокой температуры и сохраняет агглютинирующую активность при нагревании до 100°C.

Кораллан выделен из гомогената мягкого коралла *Pseudopterogorgia americana*, широко распространенного в водах Карибского бассейна. В его состав входит белковая составляющая и полисахаридный компонент, связанные между собой прочной ковалентной связью. Полисахаридная часть этого протеогликана является сульфатированным гликуроногликаном. В таблице 3 представлены аналитические данные для кораллана.

Таблица 3.

Состав	Кораллан
Моносахариды	48,5
Белок	18,4
Нуклеиновые кислоты	0,5
Уроновые кислоты	9,2
Гексозамины	2,1
Сульфат	7,3
Азот	2,9
Зола	8,0

Химическая структура полисахаридной части кораллана представлена на рис. 1.

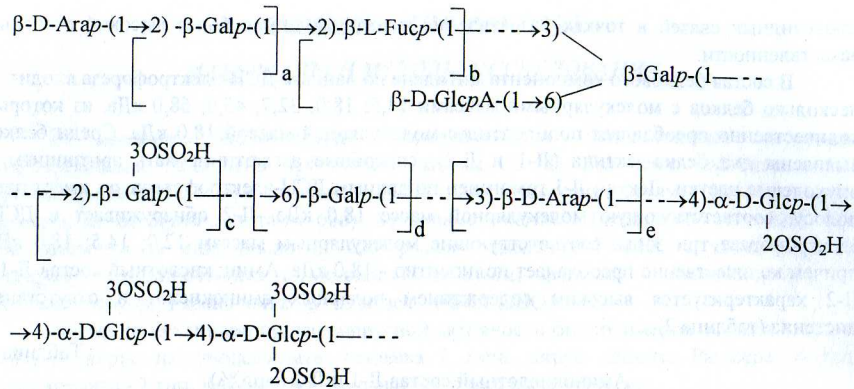


Рис.1. Структурные участки полисахаридного компонента кораллана.

	m	n	R
1	1	2	H
2	1	6	H
3	1	10	H
4	1	14	H
5	1	10	OH
6	1	10	OCOCH <sub>3</sub>
7	1	10	OCO(CH <sub>2</sub> ) <sub>12</sub> CH <sub>3</sub>
8	2	10	H
9	2	10	OH
10	3	10	H
11	3	10	OH

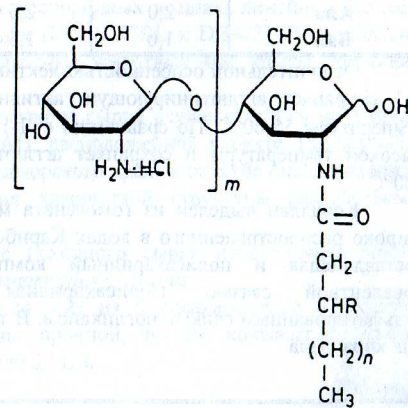


Рис.2. Структуры производных хитоолигосахаридов, подтвержденные аналитическими данными и физико-химическими методами исследования.

Производные хитоолигосахаридов (источник получения - хитин краба) общей формулы, представленной на рис.2 получены путем синтеза, который вели избирательным ацилированием аминогрупп, содержащихся в молекуле хитоолигосахида.

Зостерин представляет собой сложный углеводный полимер пектиновой природы, выделенный из морских трав сем. *Zosteraceae*. В основной углеводной цепи он состоит из блоков  $\alpha(1\rightarrow4)$  полигалактуроновой кислоты, соединенных между собой  $(1\rightarrow2)$  связями рамнозы (рис.3). Примерно на четверть молекула зостерина представляет собой апиогалактуронан, содержащий D-апиозу, присоединенную  $(1\rightarrow2)$  и  $(1\rightarrow3)$  связями к галактуронану. Другие боковые цепи зостерина содержат D-ксилозу, D-галактозу, L-арабинозу и 2-O-метил-D-ксилозу.

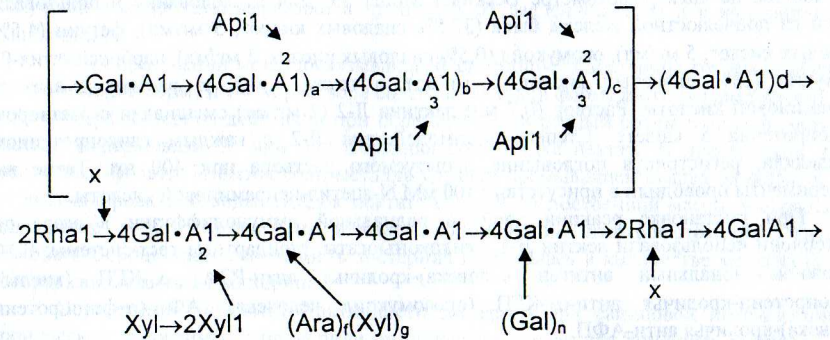


Рис.3. Структура молекулы зостерина (a,b,c... - число единиц, x - боковая цепь с неидентифицированным углеводным составом).

Фукоидан или фукансульфат - сульфатированный полисахарид, выделенный из бурой водоросли Японского моря ламинарии (*Laminaria japonica*). Основным моносахаридом полимера является L-фукоза, содержащая, главным образом,  $\beta(1\rightarrow2)$  связи, а также связи типа  $1\rightarrow3$  и  $1\rightarrow4$ .

Низкомолекулярный сульфатированный полисахарид - уронофукан, также выделен из *Laminaria japonica*. Его молекулярная масса менее 20 кДа. Фукоза в составе уронофукана сульфатирована по 4-му положению, остатки которой связаны гликозидными связями и коррелируют с уроновыми кислотами при соотношении 1:4 ( $\text{SO}_3\text{-Fuc}$ ;  $\text{UA-COOH}$ ).

Цитотоксическое действие биополимеров оценивали по выходу  $\text{K}^+$  из клеток карциномы Эрлиха. Данный показатель характеризует степень мембранолитического действия конкретного вещества.

Концентрацию ионов калия в ячейке измеряли с помощью  $\text{K}^+$  селективного электрода и милливольтметра OP-208/1 ("Radelkis"). Регистрацию выхода  $\text{K}^+$  производили с помощью самописца, количество ионов  $\text{K}^+$  выражали в мкМ за единицу времени измерения (мин.).

Цитостатическую активность биополимеров определяли по включению  $^{14}\text{C}$ -тимидина в ДНК опухолевых клеток. Все радиометрические измерения проводили на сцинтилляционном счетчике "Mark-III" (Nuclear Chicago, США).

С целью установления спектра противоопухолевого действия биополимеров использовали ряд несингенных и сингенных штаммов опухолей: L-1210, LLC, AK755,

АКАТОЛ, мел.В16, саркома 37 и карцинома Эрлиха. Перевивку и поддержание штаммов осуществляли по методике, принятой в ВОИЦ АМН РФ. Исключение составляли опыты, в которых оценивалась напряженность иммунологического статуса организма, пораженного опухолью и, в связи с этим, строго учитывались количества прививаемых опухолевых клеток.

Манифестацию лектиновых рецепторов определяли методом непрямо́й иммунофлуоресценции. Интенсивность флуоресценции оценивали с помощью флуоресцентного микроскопа ЛЮМАМ ИУФ-1 (ЛМО) (лампа ДРШ-250-3, фильтр СС-15-2). В качестве контроля служили клетки карциномы Эрлиха, не инкубированные с лектином и IgG, но инкубированные с ослиной сывороткой + FITC.

Взаимодействие лектина Л-2 с сиалогликопротеинами определяли по поглощению при 400 нм на спектрофотометре Beckman Model 35. Для исследования использовали муцин из подчелюстной железы быка (37,5% сиаловых кислот, 5 мг/мл), фетуин (4,5% сиаловых кислот, 5 мг/мл), овомукоид (0,5% сиаловых кислот, 5 мг/мл), карбоксиметил- $\beta$ -овомуцин (13% сиаловых кислот, 5 мг/мл), а также - 0,2 М раствор N-ацетил-нейраминной кислоты. Раствор (0,7 мл) лектина Л-2 (2 мг/мл) смешивали с раствором гликопротеина в кювете. Степень взаимодействия Л-2 с каждым гликопротеином определяли, регистрируя поглощение испытуемого раствора при 400 нм. Такие же эксперименты проводили в присутствии 100 мМ N-ацетил-нейраминной кислоты.

При постановке реакции двойной радиальной иммунодиффузии в агаре по Оухтерлони использовали лектин Л-1, гликоконъюгаты, стандартные тест-системы: РЭА (раково-эмбриональный антиген человека)-кроличья анти-РЭА,  $\alpha_1$ -КГП (кислый гликопротеин-кроличья анти- $\alpha_1$ -КГП (орозомукоид человека), АФ ( $\alpha$ -фетопроtein человека)-кроличья анти-АФП.

Для определения молекулярно-эпитопной специфичности лектина Л-1 применяли реакцию конкурентного ингибирования агглютинации клеток карциномы Эрлиха. В качестве сахаров свидетелей использовали метил- $\beta$ -D-глюкопиранозид, метил- $\beta$ -L-арабинопиранозид, 3-, 4- и 6-моно-O-м<sup>2</sup>тиловые эфиры метил- $\beta$ -D-галактопиранозид, метил- $\alpha$ -галактопиранозид, метил- $\beta$ -галактопиранозид, 2-O-метиловый эфир- $\beta$ -D-галактопиранозид.

В экспериментах были использованы методики, соответствующие поставленным задачам по выявлению иммуотропного действия исследуемых биополимеров, равно как и механизма их действия. Для этого использовали следующие иммунологические тесты: метод локального иммунного гемолиза (по A.Cunningham в модификации В.Н.Каледина с соавт., 1975), метод определения иммунных розеткообразующих клеток (Б.Е.Эллиот, 1981), серологические методы, реакция гиперчувствительности замедленного типа (P.H.Lagrange et al., 1981), метод оценки специфических Т-супрессоров (F.L.Wister, J.D.Stobo, 1976), определение фактора некроза опухолей (D.K.K.На, 1985), методы оценки функциональной активности макрофагов (использовали следующие критерии оценки: интенсивность биосинтеза белка, фагоцитарная активность в отношении про- и эукариотических клеток, способность ингибировать включение <sup>3</sup>H-тимидина в ДНК клеток-мишеней, а также по критерию снижения активности 5'нуклеотидазы-эктофермента плазматической мембраны), определение митогенной активности (интенсивность клеточной пролиферации оценивали по включению <sup>3</sup>H-тимидина).

Антигеморрагическую активность определяли на модели скрытого кишечного кровотечения. Животных подвергали гамма-облучению (6,5 Гр) и затем в фекалиях облученных животных регистрировали количественное содержание гемоглобина. Гемоглобин определяли сравнением абсорбции (при 460 нм) со стандартной кривой для очищенного гемоглобина.

Оценку степени гетерогенности молекулярной массы зостерина определяли методом гель-проникающей распределительной хроматографии.

Фармакокинетические свойства зостерина исследовали на мышцах-гибридах ВDF<sub>1</sub>. Использовали <sup>3</sup>H-зостерин, меченный бортритидом натрия по восстановленному концу, с удельной радиоактивностью 7,5 мкКи/г. Через определенные промежутки времени после введения меченого вещества (per os) устанавливали распределение радиоактивности в организме животных. Измерение радиоактивности солиобилизованных образцов проводили на жидкостном сцинтилляционном счетчике "Mark-III" ("Nuclear Chicago", США). Гашение радиоактивности образцов учитывали методом "внутреннего стандарта". В качестве стандарта использовали заведомо известное количество <sup>3</sup>H-зостерина. Полученные результаты выражали в процентах от введенной дозы и в имп./мин-г или имп./мин-мл.

При определении металlosвязывающей способности зостерина готовили образцы (0,05%-ные растворы) и 10<sup>-2</sup>М раствора солей металлов (в форме азотнокислых солей). К 50 мл р-ра зостерина добавляли при перемешивании равный объем р-ра соли металла. Раствор выдерживали 30 мин для формирования осадка пектата и фильтровали через стеклянный фильтр. Избыток соли металла удаляли промыванием осадка на фильтре 100 мл дистиллированной воды. Осадок пектата сушили до постоянной массы и определяли содержание в нем металла на атомно-абсорбционном спектрофотометре "Хитачи" (Япония). Сорбционная способность зостерина выражалась в количестве металла (в мг), которое связывается 1 г зостерина.

Определение антидотной активности зостерина при свинцовой интоксикации в хроническом эксперименте проводили на половозрелых самцах линейных мышей (СВА) массой 24-26 г, разделенных на соответствующие группы. Одной группе мышей (контроль) в течение 40 дней ежедневно перорально вводили раствор уксуснокислого свинца в дозе 50 мг/кг массы животного. Другим группам животных в смеси с раствором уксуснокислого свинца (50 мг/кг) вводили растворы зостерина (300 мг/кг) и цитрусового пектина (300 мг/кг) (положительный контроль). Все животные в течение 40 дней наблюдения находились на стандартном рационе питания в условиях вивария. На протяжении эксперимента у них определяли уровень свинца в крови, кале и моче, а также его содержание в костях и внутренних органах, являющихся местом депонирования свинца. Количественное содержание свинца в биосубстратах определяли атомно-абсорбционным методом на спектрофотометре фирмы "Хитачи" (Япония).

Определение декорпорирующего действия зостерина проводили на модели свинцового носительства. Для воспроизведения модели свинцового носительства животным (мыши) в течение 15 дней вводили per os раствор уксуснокислого свинца из расчета 100 мг/кг. По истечении указанного срока животные в течение 2 нед не получали свинец. Этот перерыв необходим для элиминации из организма неинкорпорированных форм свинца. Затем животных разбивали на группы, из которых одна служила контролем, другие - экспериментальной моделью. Опытные группы в течение 2 нед получали в поилках ad libitum водные растворы (0,1%, 0,5%, 1%) зостерина. Контрольная группа получала питьевую воду. По окончании эксперимента у животных определяли содержание инкорпорированного свинца в костной ткани, являющейся главным депо свинцового носительства в организме.

Для оценки предотвращения всасывания радионуклидов (<sup>137</sup>Cs и <sup>89</sup>Sr) при транзите последних через кишечник готовили водные растворы, содержащие смесь зостерина и исследуемые изотопы соответственно. Полученные растворы вводили мышам per os (по 0,3 мл/мышь) и помещали их в лабораторные клетки, содержащие виварный корм и воду

(ad libitum). По истечении 24 ч у животных определяли уровень накопления радионуклидов в крови и костной ткани с помощью  $\gamma$ -счетчика "gamma Trac" (США).

При определении антидотной активности зостерина у рабочих свинцово-цинковых предприятий использовали 0,5%- и 1%-ные растворы (200 мл) внутрь 1 раз в день утром натощак за 15-20 мин до еды. Курс приема составлял 1 мес с последующим недельным перерывом. У всех рабочих в начале наблюдений, через 12 дней и в конце наблюдений определяли уровень свинца в крови, моче и кале, а также содержание дельта-аминолевулиновой кислоты и копропорфирина в моче (наиболее показательные биохимические признаки свинцовой интоксикации).

Для определения активности трипсина, химотрипсина и липазы использовали 0,05M Трис-НСl буфер (рН 7,8), содержащий СаCl<sub>2</sub> в концентрации 0,01M. Активность пепсина определяли в 0,06N HCl (рН 1,8). Активность амилазы определяли в фосфатном буфере (рН 7,1), содержащем 6% бычьего сывороточного альбумина для стабилизации. В работе использовали 0,01% растворы ферментов в соответствующих буферных растворах. Активность трипсина определяли спектрофотометрически с использованием в качестве субстрата бензоиларгининпаранитроанилида в соответствующем буфере. Активность химотрипсина и пепсина определяли спектрофотометрически по методу Кунитца с использованием в качестве субстрата 1%-ного раствора казеина. Активность амилазы определяли спектрофотометрически по методу Каравея, используя в качестве субстрата растворимый крахмал, который гидролизует  $\alpha$ -амилазой с образованием конечных продуктов, не дающих цветной реакции с йодом. Активность липазы определяли спектрофотометрически по изменению мутности суспензии оливкового масла под действием фермента при 340 нм. Влияние исследуемых препаратов на активность ферментов выражали в % от контрольной активности чистого фермента с соответствующим субстратом в данное инкубационное время, принимаемую за 100%.

Статистическая обработка результатов экспериментов проводилась методами вариационной статистики с использованием t-критерия Стьюдента.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

### МИТИЛАН

**Противоопухолевая активность.** Токсикологические исследования на мышах показали, что митилан является практически не токсичным биополимером: при внутрибрюшинном введении ЛД<sub>50</sub> составила 1200 мг/кг, а при введении per os отмечено полное отсутствие токсичности. Именно с этих позиций устанавливался режим введения и разовая доза митилана.

Из таблицы 4 видно, что митилан проявляет противоопухолевую активность при различных штаммах солидных опухолей. К нему чувствительна аденокарцинома молочной железы АК755 - 83%, эпидермоидная карцинома легкого Льюис - 67%, аденокарцинома толстой кишки (АКАТОЛ) - 67%. Менее чувствительной к ингибирующему действию митилана является меланома В16 - 52%, при этом эффект обнаруживается лишь в дозе 50 мг/кг. Применение препарата per os не дало положительных результатов. По-видимому, химическая структура митилана при пероральном введении нарушается пищеварительными ферментами, что приводит к потере его активности.

При изучении совместного профилактического и посттрансплантационного воздействия митилана на рост солидных форм опухолей было установлено, что трехкратное введение митилана в дозах 50 и 100 мг/кг до и двукратное после прививки опухоли приводит к более высокому проценту торможения опухолевого роста, чем

Таблица 4.

Действие митилана на рост сингенных опухолей

Штамм опухоли	Доза мг/кг интервал (час) x количество введений	Способ введения	Масса опухоли, мг M ± m	Торможение роста (%)
<u>АК755</u>	25/24 x 5	в/б	2541 ± 276	б/эф
	50/24 x 5	в/б	1520 ± 211*	42
	100/24 x 5	в/б	446 ± 58**	83
	-	-	2635 ± 386	-
	Контроль	-	-	-
<u>ЛЛС</u>	25/24 x 5	в/б	1593 ± 237*	56
	50/24 x 5	в/б	1593 ± 237*	56
	100/24 x 5	в/б	1217 ± 186**	67
	200/24 x 5	в/б	3312 ± 593	б/эф
	-	-	3781 ± 654	-
<u>АКАТОЛ</u>	25/24 x 5	в/б	1106 ± 110	б/эф
	50/24 x 5	в/б	540 ± 113*	51
	100/24 x 5	в/б	612 ± 79*	45
	200/24 x 5	в/б	377 ± 92**	67
	-	-	1126 ± 98	-
<u>Мел. В16</u>	25/24 x 5	в/б	3670 ± 655	б/эф
	50/24 x 5	в/б	1684 ± 479*	52
	100/24 x 5	в/б	3173 ± 525	б/эф
	200/24 x 5	в/б	3716 ± 683	б/эф
	Контроль	-	3518 ± 439	-

\* p < 0,05; \*\* p < 0,01; в/б - внутрибрюшинно.

раздельное (только профилактическое или только посттрансплантационное). Так, в дозах 100 мг/кг при предварительном или посттрансплантационном введении митилана процент торможения не превышает 65-70%, а сочетание обеих схем лечения приводит к повышению процента торможения до 90%.

Учитывая перспективу применения малотоксичных биополимеров в комбинации с противоопухолевыми цитостатиками, мы исследовали возможность повышения с помощью митилана противоопухолевого действия циклофосфана, как наиболее широко используемого в онкологической практике препарата. Было установлено, что митилан и циклофосфан в отдельности значительно менее эффективны в отношении показателя прививаемости опухолевых трансплантатов, чем при сочетанном их действии: прививаемость у мышей леченных митиланом составляет 50%, циклофосфаном в дозе 100 мг/кг - 60%; совместное применение дает значительно меньший процент прививаемости опухолей - 10%. Близкие результаты получены и при обратной схеме лечения - циклофосфан, а затем митилан. Процент прививаемости при лечении митиланом оказался равным 66%, циклофосфаном в дозе 100 мг/кг - 55%, в то же время их сочетанное применение привело к снижению процента прививаемости до 22.

Немаловажным является способность митилана восстанавливать наблюдаемую лейкопению до показателей, сравнимых с контрольными. Так, если введение циклофосфана сопровождается снижением количества лейкоцитов до 4,02-4,8 тыс/мкл, то при совместном введении циклофосфана с митиланом, число лейкоцитов, практически соответствует контрольным показателям - 7,6-8,2 тыс/мкл. Таким образом, митилан предотвращает падение числа лейкоцитов в периферической крови, вызванное циклофосфаном, и, тем самым, способствует восстановлению лейкопоза. Этому процессу способствуют и другие реактивные изменения, наблюдаемые при введении митилана мышам: при изучении цитологических сдвигов в селезенке, в регионарных и отдаленных лимфоузлах отмечается усиление митотической активности лимфоидных клеток, пролиферация белого ростка и появление очагов экстрамедуллярного кроветворения в лимфатических узлах, плазмоцитарная реакция, бластная реакция, значительное увеличение числа переходных ретикулярных клеток. Полученные данные позволяют заключить, что митилан усиливает противоопухолевое действие циклофосфана на фоне нормализации состояния ретикулоэндотелиальной системы организма, что является важным критерием при учете стратегии химиотерапии злокачественных новообразований.

При изучении влияния митилана на иммунологическую реактивность интактного и опухолевого организма обнаружен стимулирующий эффект, оцениваемый по следующим критериям: антителообразования (стимуляция в 2-2,5 раза), реакция гиперчувствительности замедленного типа (в 2 раза), розеткообразования в тимусе и селезенке (в 2 раза). В другой постановке экспериментов по изучению влияния митилана на иммунологическую реактивность организма исследовали его митогенное действие в условиях *in vitro* и *in vivo*. Из результатов, приведенных в таблице 5, следует, что митилан в дозе 100 мкг/мл через 48 часов инкубации *in vitro* достоверно повышает показатель реакции бласттрансформации (БТ) лимфоцитов селезенки, хотя значительно уступает по своему действию известному митогенному стимулятору - Кон А. У мышей, обработанных митиланом (таблица 6), отмечается двухфазная реакция БТ лимфоцитов, выражающаяся в снижении (через 48 часов) и последующем восстановлении (через 72 часа) митогенного ответа с достоверно значимой тенденцией усиления включения  $^3\text{H}$ -тимидина в клетки селезенки мыши.

Исследовано влияние митилана на функциональную активность макрофагов. Из данных, приведенных на рис.4, прослеживается нелинейная временная зависимость интенсивности биосинтеза белка в макрофагах перитонеальной полости мышей. Уже

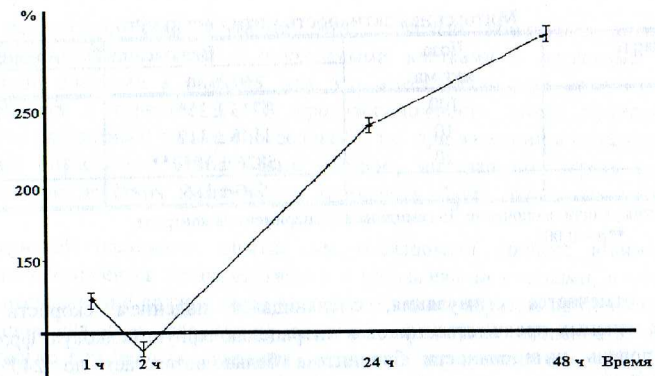


Рис. 4. Влияние митилана на интенсивность биосинтеза белка в перитонеальных макрофагах.

По оси ординат - значения интенсивности биосинтеза белка в процентах. Контроль принят за 100%; митилан в дозе 50 мг/кг, введенный за 1, 2, 24, 48 часов до извлечения клеток перитонеальной полости.

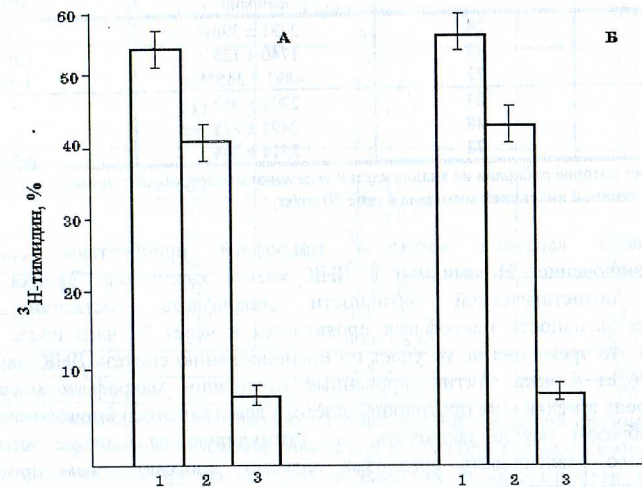


Рис. 5. Влияние митилана на интенсивность цитостатической активности (ЦСА) перитонеальных макрофагов.

А - показатели ЦСА макрофагов (МФ), извлеченных через 4 ч после введения митилана;  
Б - то же, через 24 часа;

По оси ординат включение  $^3\text{H}$ -тимидина (в имп/мин  $\cdot 10^3$ ):  
1 - в опухолевые клетки (ОПК), не инкубированные с МФ; 2 - в ОПК контрольных мышей;  
3 - в ОПК мышей, получавших митилан.



Таблица 5.

Митогенная активность митилана *in vitro*

Препарат	Доза мкг/мл	Включение <sup>3</sup> H-тимидина	
		имп/мин	ИС
Митилан	100	1713 ± 35*	1,76
Митилан	10	1148 ± 117	1,18
Кон А	10	5826 ± 1017**	6,01
Контроль	-	970 ± 186	-

ИС - индекс стимуляции: включение <sup>3</sup>H-тимидина в эксперименте/в контроле.

\*p<0,005; \*\*p < 0,001.

через час отмечается стимуляция, сменяющаяся падением скорости включения экзогенных меченых предшественников в интрацеллюлярную белковую фракцию. Через 24 часа уровень интенсивности биосинтеза белка возрастает до 240%. Скорость биосинтеза белка в макрофагах мышей, обработанных митиланом, продолжает расти вплоть до 48 часов после введения.

Изучено также влияние митилана на интенсивность макрофагальной цитостатической активности макрофагов. Из рис.5 видно, что уже через 4 часа после

Таблица 6.

Митогенная активность митилана *in vivo*

Препарат	Т*	Включение <sup>3</sup> H-тимидина	
		имп/мин	ИС
Митилан	24	2231 ± 390	1,1
	48	1740 ± 125	0,69
	72	4893 ± 305**	1,94
Контроль	24	2202 ± 352	-
	48	2492 ± 273	-
	72	2514 ± 208	-

\* Т - время, через которое отбирали на анализ клетки селезенки мышей, обработанных внутрибрюшинной инъекцией митилана в дозе 50 мг/кг.

\*\* p<0,05

внутрибрюшинного введения митилана макрофаги приобретают способность ингибировать включение <sup>3</sup>H-тимидина в ДНК клеток карциномы Эрлиха. Степень выраженности цитостатической активности макрофагов достаточно высока. Цитостатическая активность макрофагов проявляется и через 24 часа после введения биополимера. В это время она не уступает по ингибированию синтеза ДНК макрофагам, извлеченным через 4 часа. Активизированные митиланом макрофаги могут играть существенную роль в механизме противоопухолевого действия этого биополимера.

Таким образом можно заключить, что стимулирующее влияние митилана на иммунологическую реактивность организма является многозвеньевым процессом и затрагивает ключевые реакции иммунологического надзора за неоплазийным ростом.

При изучении механизма противоопухолевого действия митилана перед нами стояла задача изучить роль и долю участия в этом процессе двух составляющих митилан компонентов - полисахаридного (α-D-глюкан) и белкового (лектины: Л-1 и Л-2).

Сравнительную оценку противоопухолевой активности митилана и его компонентов проводили при двух формах (асцитная и солидная) карциномы Эрлиха и саркомы 37. Из полученных результатов следует, что митилан проявляет выраженную противоопухолевую активность как при солидных, так и асцитных формах опухолей. Вместе с тем, белковый компонент (Л-1 и Л-2) был активен только при асцитных формах опухолей (выраженный эффект), а полисахаридный - при солидных (слабый эффект). Из

полученных результатов следует также, что белковый компонент активен при непосредственном взаимодействии с опухолевыми клетками в организме, т.е. при непосредственном введении в опухоль, как это имеет место при асцитных формах карциномы Эрлиха и саркомы 37. В противоположность этому полисахаридный компонент митилана активен только опосредовано, т.е. при введении в отдаленное место от локализации опухолевого очага. Таким образом, митилан по широте и качеству противоопухолевого действия превосходит активность своих отдельных структурных компонентов.

В следующей постановке опытов мы исследовали процесс взаимодействия митилана и его компонентов непосредственно с опухолевыми клетками, в условиях *in vitro*. Данное исследование должно было установить каким образом противоопухолевый эффект лектинов связан с маршрутом введения, поскольку активность последних проявляется только при непосредственном введении в опухолевый очаг. Из таблицы 7 следует, что Л-1 проявляет наиболее выраженное цитотоксическое действие в отношении клеток карциномы Эрлиха и саркомы 37. Полисахаридный компонент митилана не оказывает цитотоксического действия, чем и объясняется отсутствие его эффекта при асцитных опухолях *in vivo*.

Таблица 7.

Влияние митилана и его структурных компонентов на опухолевые клетки *in vitro*

Вещество	Концентрация мкг/мл	% погибших клеток	
		Карцинома Эрлиха M ± m	Саркома 37 M ± m
Митилан	10	3,6 ± 0,6	3,5 ± 0,2
	100	4,1 ± 0,5	3,4 ± 0,5
	300	4,5 ± 0,7	3,7 ± 0,5
	500	6,3 ± 1,3	6,6 ± 0,1
Полисахаридный компонент митилана	500	3,5 ± 0,7	3,1 ± 0,4
Л-1	10	3,9 ± 0,3	3,5 ± 0,3
	30	30,5 ± 3,1	29,8 ± 2,6
	50	80,4 ± 0,7	75,1 ± 4,3
Л-2	10	3,4 ± 0,5	3,8 ± 0,2
	30	8,8 ± 0,9	14,5 ± 0,4
	50	40,6 ± 3,4	51,6 ± 3,5
Контроль (до инкубации)		2,4 ± 0,4	3,4 ± 0,1
Контроль (после инкубации)		3,2 ± 0,4	3,4 ± 0,1

На первый взгляд возникает парадоксальная ситуация: с одной стороны, митилан и лектин обладают противоопухолевой активностью *in vivo* при введении в место прививки опухолевого инокулята, с другой стороны, в условиях *in vitro* митилан в отличие от лектина не проявляет цитотоксического действия. Парадоксальность ситуации объясняется тем, что *in vivo* (в отличие от *in vitro*) биологические жидкости организма содержат ферменты, а также фагоцитирующие элементы, приводящие к деструкции митилана на составляющие компоненты. Именно в этом случае "свободные" цитотоксичные лектины проявляют ингибирующее действие на опухолевые клетки. В эксперименте *in vitro* при отсутствии условий, приводящих к деструкции митилана последний сохраняет свою комплексную структуру, что и ограничивает клеточную интернализацию входящих в его состав цитотоксичных лектинов. Отсутствие клеточной интернализации лектинов в составе митилана было подтверждено *in vitro* с использованием метода непрямой иммунофлуоресценции.

Для выяснения механизма цитотоксического действия белкового компонента мы исследовали динамику взаимодействия Л-1 (количественно преобладающий лектин в составе белкового компонента) с клетками карциномы Эрлиха. О результатах взаимодействия судили по выходу из опухолевых клеток ионов К. Настоящий тест позволяет регистрировать ранние летальные биохимические изменения. Как видно из рис.6, уже в течение 60 мин взаимодействия лектина и опухолевых клеток наблюдается прогрессирующее истечение ионов К, приводящее в конечном итоге к гибели клеток. Вместе с тем, добавление в инкубационную среду галактозы (0,2 мМ) - специфического

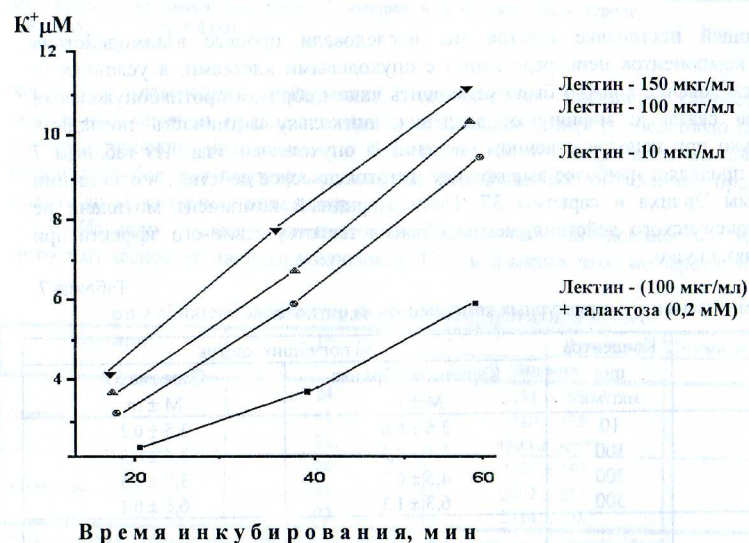


Рис.6. Дозависимое влияние галактозоспецифичного лектина из мидии *S. grayanus* на выход ионов  $K^+$  из клеток карциномы Эрлиха

углевода, блокирующего лектиновую активность Л-1 приводит к значительному снижению выхода ионов К, что свидетельствует о специфическом взаимодействии лектина с рецепторными лигандами клеток карциномы Эрлиха. В подтверждение этому методом непрямой иммунофлуоресценции была проведена визуализация взаимодействия лектина с клетками карциномы Эрлиха. Установлено, что в течение 60 мин их совместного инкубирования регистрируются 2 этапа взаимодействия: рецепция лектина на поверхности клеток и его последующая интернализация. Процесс интернализации лектина совпадает с началом гибели опухолевых клеток. Добавление галактозы блокирует связывание лектина только в начальный период лиганд-рецепторного взаимодействия, т.е. до начала интернализации.

Было установлено также (рис.7), что галактозоспецифичный лектин Л-1 выступает в роли фактора, усиливающего естественную макрофагальную цитотоксичность к опухолевым клеткам. Наблюдаемый процесс, скорее всего, обусловлен не только собственно активизацией лектином макрофагов, но и усилением их контактного взаимодействия с опухолевыми клетками: при экспозиции мышинных макрофагов и клеток карциномы Эрлиха в присутствии лектина образуются ассоциаты в форме розеток (добавление галактозы приводит к диссоциации розеток на одиночные клетки).

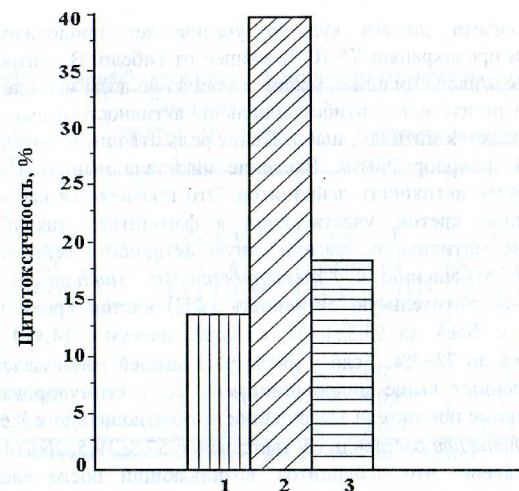


Рис.7. Цитотоксичность макрофагов (МФ) к клеткам карциномы Эрлиха в присутствии галактозоспецифичного лектина из мидии *S. grayanus* и галактозы.

По оси абсцисс: 1 - (МФ + опухолевая клетка);

2 - МФ + опухолевая клетка + лектин - 5 мкг/мл);

3 - (МФ + опухолевая клетка + лектин - 5 мкг/мл + галактоза - 0,2 мМ).

Лектинииндуцированное участие макрофагов в опосредовании противоопухолевого действия, вероятно, отвечает за способность митилана, как это было показано нами ранее, стимулировать цитотоксический потенциал макрофагов. На основании вышеизложенных результатов мы должны заключить, что митилан как целостный полисахарид-белковый комплекс реализует свое противоопухолевое действие двумя путями: прямым - повреждающим опухолевые клетки и опосредованным - через иммунобиологические реакции организма.

При непосредственном введении митилана, равно как и митилановых лектинов, в опухолевый очаг преобладает первый путь противоопухолевого действия, хотя и второй путь также вовлекается в этот процесс, но его роль, в данном случае, незначительна.

Отсутствие у лектинов митилана опосредованного противоопухолевого эффекта (то есть при введении в отдаленный участок от опухолевого очага), как и слабый опосредованный эффект, свойственный полисахаридному компоненту митилана, подтверждает, что митилан, как целостный природный комплекс, гораздо эффективнее отдельно взятых его структурных компонентов.

Способность митилана повышать биологическую реактивность интактного и опухолевого организма, положительно влиять на его иммунологическую реактивность (стимуляция иммуногенеза, митогенная активность в условиях *in vitro* и *in vivo*, усиление функциональной и цитостатической активности макрофагов), дополняется другой необычной способностью этого биополимера: оказывать прямое цитотоксическое действие на опухолевые клетки. Настоящий феномен может проявлять только комплексное соединение, несущее в себе структурные компоненты разнонаправленного характера действия, что по сути и определяет митилан как противоопухолевый препарат сложного механизма действия.

**Антибактериальная активность.** Исследование митилана проводили на экспериментальных моделях - псевдотуберкулезной и сальмонеллезной инфекциях белых беспородных мышей. Подкожное введение митилана в дозе 100 мкг за сутки до заражения

животных смертельными дозами культур увеличивает продолжительность жизни животных в 2 раза и предохраняет 75-100% мышей от гибели. В контрольных группах в тех же условиях не выживало ни одной мыши. Увеличение дозы митилана не приводило к усилению эффекта. При изучении антибактериальной активности стимуляторов иммунной системы, каковым является митилан, значительная роль отводится фагоцитозу как одному из факторов защиты макроорганизма. Введение митилана мышам и морским свинкам изменяет фагоцитарную активность лейкоцитов. Это проявляется как в количественном увеличении популяции клеток, участвующих в фагоцитозе, так и в усилении их активности. Влияние митилана на фагоцитарную активность лейкоцитов крови было изучено *in vitro* по отношению к *Y.pseudotuberculosis*, *Staph.aureus* и *S.typhimurium*. Митилан усиливал поглотительную активность (ФП) клеток крови по отношению к *Y.pseudotuberculosis* с  $20 \pm 4$  до  $93,3 \pm 1,4\%$ , к *Staph. aureus* с  $14,4 \pm 4$  до  $50,6 \pm 3,5\%$ , к *S.typhimurium* с  $8,0 \pm 4$  до  $78 \pm 2\%$ . Если у интактных мышей наблюдался незавершенный фагоцитоз перечисленных выше микроорганизмов, то у стимулированных митиланом животных максимальные показатели завершенности по отношению к *Y.pseudotuberculosis*, *Staph. aureus* и *S.typhimurium* составили соответственно  $57,8 \pm 19,5$ ,  $26,6 \pm 4,6$  и  $63,5 \pm 22,0\%$ .

Было установлено, что лейкоцитоз, возникающий после введения митилана, сопровождается увеличением количества незрелых (палочковидных и юных) форм нейтрофильных лейкоцитов. Эти клетки содержат большое количество так называемых первичных гранул богатых ферментами, которые определяют переваривающую активность лейкоцитов и макрофагов, обеспечивая завершенность фагоцитоза. Митилан, введенный мышам за сутки до заражения их вирулентным штаммом *Y.pseudotuberculosis*, *Staph. aureus*, *S. typhimurium*, активизирует поглотительную и переваривающую функции макрофагов перитонеального экссудата в опытах *in vivo*. По сравнению с контролем препарат увеличивал фагоцитарную активность макрофагов и полиморфноядерных лейкоцитов в 2-2½ раза. В результате у этих животных очищение экссудата брюшной полости происходило значительно быстрее, чем у контрольных мышей (в опыте - через 7 ч после заражения, в контроле - через 36-48 ч, причем не у всех животных).

Активизирование макрофагов при введении митилана является, по сути, одним из ключевых моментов антибактериальной активности этого биополимера. Для суждения о механизме запуска суперактивности макрофагов важное значение имеет оценка таковой при сравнении двух показателей: доза препарата-индуктора (митилана) и активность клетки-мишени (макрофага). Мы исследовали функциональную активность макрофагов под действием митилана по критерию снижения активности 5'-нуклеотидазы-эктофермента плазматической мембраны. 5'-нуклеотидазную активность макрофагов перитонеальной полости мышей изучали при различных маршрутах введения возрастающих доз митилана. При этом использовали две модели *in vivo*: на мышях линии СВА и белых беспородных (неинбредные). Введение митилана в дозе 5 мг/кг не вызывает снижения 5'-нуклеотидазной активности ни при подкожном, ни при внутрибрюшинном введении (таб.8). Подкожное введение митилана в дозе 25 мг/кг обуславливает снижение 5'-нуклеотидазной активности через 1 сутки как у неинбредных мышей, так и у мышей линии СВА. При этом ферментативная активность у неинбредных животных уменьшалась в 1,4 раза и у мышей линии СВА - в 1,2 раза по сравнению с контролем. Внутрибрюшинное введение митилана в дозе 25 мг/кг сопровождается значительным снижением 5'-нуклеотидазной активности перитонеальных макрофагов мышей линии СВА. Полученные результаты указывают на то, что в макрофагах мышей после введения митилана происходит положительная модуляция активности мембраносвязанной 5'-нуклеотидазы.

Таблица 8.

Изменение 5'-нуклеотидазной активности\* перитонеальных макрофагов под действием митилана

Условия опыта		Подкожное введение митилана		Внутрибрюшинное введение митилана	
		1 сутки	7 сутки	21 сутки	42 сутки
Неинбредные мыш	Контроль (интактные животные)				
	Митилан 5 мг/кг	$61,5 \pm 1,00$	$60,8 \pm 1,0$	$61,5 \pm 1,6$	$60,8 \pm 1,1$
	Митилан 25 мг/кг	$63,0 \pm 2,69$	$62,3 \pm 2,4$	$60,95 \pm 1,47$	$63,2 \pm 2,07$
Мыши линии СВА	Контроль (интактные животные)				
	Митилан 5 мг/кг	$44,2 \pm 5,91^{**}$	$41,35 \pm 1,35^{**}$	$26,96 \pm 1,18^{**}$	$35,44 \pm 1,24^{**}$
	Митилан 25 мг/кг	$50,7 \pm 0,86$	$30,43 \pm 0,74$	$33,04 \pm 1,29$	$32,71 \pm 0,99$
	Митилан 5 мг/кг	$48,6 \pm 0,71$	$29,95 \pm 0,89$	$32,28 \pm 1,05$	$30,5 \pm 1,2$
	Митилан 25 мг/кг	$42,0 \pm 0,8$	$20,52 \pm 0,62^{**}$	$9,32 \pm 1,0^{**}$	$16,7 \pm 2,01^{**}$

\* Активность 5'-нуклеотидазы выражена в мкг фосфора на  $10^7$  клеток.\*\*  $p < 0,05$ .

Таким образом, митилан, воздействуя на клеточные защитные реакции, оказывает влияние на состояние естественного иммунитета. Это может иметь значение не только при тех инфекциях, которые были взяты нами в качестве моделей, но и при всех патологических состояниях, при которых процессы фагоцитоза оказываются наиболее существенными.

**Лектиновая активность.** Титр лектинов (минимальная концентрация, при которой еще происходит агглютинация) в отношении суспензии клеток карциномы Эрлиха составил 0,87 мкг/мл и 0,5 мкг/мл для Л-1 и Л-2 соответственно. Л-1 является галактозоспецифичным лектином, так как ингибиторами реакции агглютинации являются D-галактоза, лактоза, раффиноза, N-ацетил-D-галактозамин. Специфичность Л-2 не была выявлена таким путем.

Для установления углеводной специфичности лектина Л-2 были исследованы варианты его преципитации с сиалосодержащими гликопротеинами: муцином из подчелюстной железы быка (32,5% сиаловых кислот), карбоксиметил-β-овомуцином (13% сиаловых кислот), фетуином (4,5% сиаловых кислот) и овомукоином (0,5% сиаловых кислот). Было установлено, что лектин Л-2 в различной степени преципитирует сиалогликопротеины (рис.8). Преципитация лектина с муцином из подчелюстной железы и с карбоксиметил-β-овомуцином ингибируется 10 мМ N-ацетил-нейраминной кислотой. На основании полученных результатов нами сделан вывод о сиалоспецифичности лектина Л-2.

В отдельном исследовании мы определяли эпитопную специфичность галактозоспецифичного лектина - Л-1. Критерием оценки служил тест по отмене индуцированной лектином агглютинации клеток карциномы Эрлиха при добавлении ряда моносахаридов, близких по структуре к D-галактозе. Было показано, что метил-α- и β-галактопиранозиды, 2-O-метилловый эфир метил-β-D-галактопиранозид так же, как и D-галактоза, ингибируют лектин-индуцированную агглютинацию клеток карциномы Эрлиха. В то же время при использовании метил-β-D-глюкопиранозиды, метил-β-L-арабинопиранозиды, а также 3-, 4- и 6-моно-O-метилловых эфиров метил-β-D-галактопиранозиды подобный эффект отсутствует. Из этих данных следует, что для связывания узнающего сайта лектина с производными D-галактозы необходимо одновременное наличие трех свободных гидроксильных групп при C-3, C-4 и C-6 в молекуле моносахарида (рис 9).

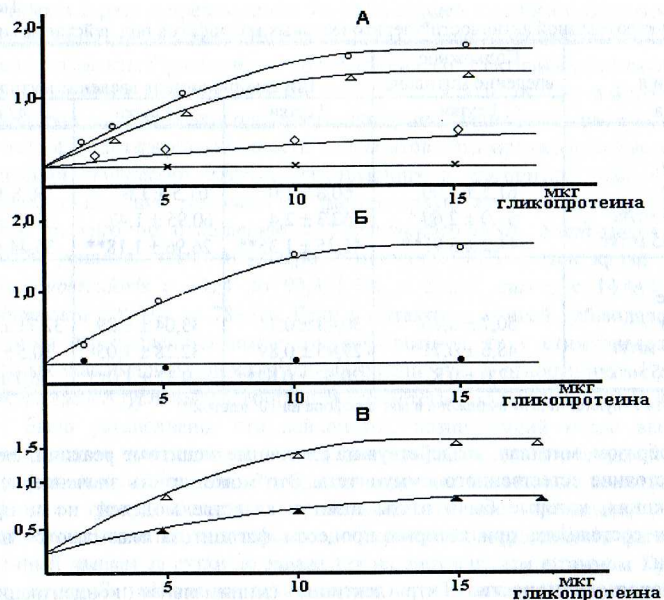


Рис. 8. Взаимодействие лектина Л-2 с сialogликопротеинами.

**А** - Преципитация Л-2 с муцином (о), карбоксиметил- $\beta$ -овомуцином ( $\Delta$ ), фетуином ( $\diamond$ ), овомукоидом (x).

**В** - Преципитация Л-2 с карбокси- метил- $\beta$ - овомуцином ( $\Delta$ ); с карбоксиметил- $\beta$ -овомуцином в присутствии N-ацетил-нейраминной кислоты ( $\blacktriangle$ ).

**Б** - Преципитация Л-2 с муцином (о); с муцином в присутствии N-ацетил-нейраминной кислоты ( $\bullet$ ).

Примечание: Взаимодействие лектина Л-2 с сialogликопротеинами определяли по поглощению при 400 нм на спектрофотометре Beckman Model 35.

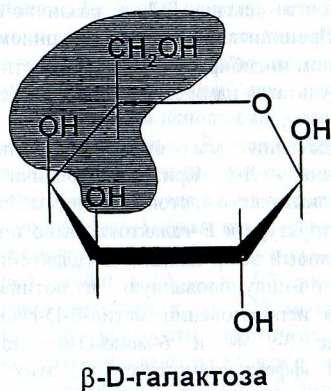


Рис. 9. Молекулярно-эпитопная специфичность лектина Л-1.

Изучены преципитирующие свойства лектина Л-1 (таблица 9). В серии тестов по выявлению преципитирующей активности лектина в отношении ряда гликопротеинов особый интерес представляет наличие специфичности лектина к раково-эмбриональному антигену.

Таблица 9.

Преципитирующие свойства лектина Л-1

Гликопротеины	Степень преципитации
Сыворотка крови	+
Сыворотка быка	+
Сыворотка кролика	$\pm$
Сыворотка эмбриональная теленка	$\pm$
Амниотическая жидкость человека	++++
Раково-эмбриональный антиген	+++ (125 мкг/мл)
$\alpha_1$ -кислый гликопротеин (орозомукоид)	++ (500 мкг/мл)
Трофобластический $\beta$ -гликопротеин (ТБГ)	-
$\alpha$ -фетопротеин	-

Данный тест может быть использован в целях ранней диагностики злокачественных новообразований, экспрессирующих на поверхности опухолевых клеток раково-эмбриональные антигены. Для лектина Л-2 показано наличие адгезивного эффекта, что выразилось в способности усиливать прикрепление клеток к сорбентам нагруженных Л-2. Имобилизованные таким образом клетки сохраняют свою жизнеспособность в течение длительного времени, что свидетельствует о перспективности использования лектина Л-2 в биотехнологии.

С целью выяснения места синтеза и функциональной роли изолированных нами лектинов непосредственно в организме продуцента, мы исследовали целомическую жидкость (гемолимфа) этого двустворчатого моллюска и циркулирующие в ней форменные элементы - целомоциты (гемоциты). При дифференциальном центрифугировании целомическая жидкость была разделена на бесклеточный супернатант и осадок, содержащий целомоциты. Как супернатант, так и клетки (трижды отмые клетки и микроорганизмы, что свидетельствовало о наличии лектинов как в самой целомической жидкости, так и в целомитах. Можно было предположить, что целомоциты являются местом синтеза лектинов Л-1 и Л-2. Действительно методом иммунофлуоресценции было подтверждено присутствие лектинов Л-1 и Л-2 в составе клеточной мембраны целомоцитов.

Тем не менее не исключалась и пассивная сорбция лектинов на поверхности клеток из целомической жидкости организма мидии. Для исключения этого предположения была проведена длительная инкубация целомоцитов в изолированной системе *in vitro* (в течение 24,48 и 72 час). Смена инкубационной среды в означенные промежутки времени и последующая лектин-специфическая идентификация подтверждает, что целомоциты являются истинными продуцентами лектинов Л-1 и Л-2.

Известно, что количественный и качественный состав микроорганизмов, ассоциированных с мидией *C. grayanus*, существенно отличается от состава воды и грунта в местах их обитания (Михайлов В.В., 1995).

Таблица 10.

Взаимодействие лектинов мидии *Crenomytilus grayanus* с различными микроорганизмами

Микроорганизмы	Лектины	
	Л-1	Л-2
<b>Грамположительные:</b>		
<i>Staphylococcus aureus</i>	+	-
<i>Arthrobacter citreus</i>	+	-
<i>Kurthia zopfii</i>	+	-
<i>Micrococcus luteus</i>	+	-
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	+	-
<i>Bacillus subtilis</i>	+	-
<i>Bacillus cereus</i>	+	-
<i>Bacillus licheniformis</i>	-	-
<b>Грамотрицательные:</b>		
<i>Serratia marcescens</i>	-	+
<i>Escherichia coli</i>	-	+
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	+
<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	-	+
<i>Yersinia frideriksenii</i>	-	+
<i>Yersinia enterocolitica</i>	-	-
<i>Proteus vulgaris</i>	-	-
<b>Морские бактерии, изолированные из мидии <i>C. grayanus</i></b>		
<i>Photobacterium</i> sp.	+	-
<i>Flavobacterium</i> sp.	+	-
<i>Pseudomonas</i> sp.	+	-

Таким образом внутренний микробный состав мидии это контролируемый комплекс. Целомоциты и продукты их жизнедеятельности, в частности, лектины осуществляют надзор за внутренней средой организма двусторчатых моллюсков (Renwrautz L., 1986). Как следует из данных, приведенных нами в таблице 10, избирательность взаимодействия лектинов с различными микроорганизмами очевидна: один из лектинов взаимодействует исключительно с грамположительными бактериями, другой - с грамотрицательными. По-видимому, лектины Л-1 и Л-2 совместно с другими факторами защиты играют определенную роль в регуляции таксономического и количественного состава микробного комплекса организма-хозяина.

### КОРАЛЛАН

**Противоопухолевая активность.** Для выбора разовой и курсовой лечебной дозы кораллана определяли его ЛД<sub>50</sub>. Последняя, устанавливаемая методом Кербера, составила 560 мг/кг. При изучении спектра противоопухолевого действия кораллана наиболее чувствительными опухолями оказались АК755 - 69% и АКАТОЛ - 82%. В свою очередь, опухоли LLC и меланома В16 менее чувствительны к кораллану (41 и 57% соответственно). Оптимальными лечебными дозами при внутрибрюшинном введении для всех исследуемых опухолей являются дозы 25 и 50 мг/кг. При пероральном введении кораллан также обнаруживает противоопухолевую активность (в дозе 200 мг/кг подавление роста АК755 и АКАТОЛ составило 62% и 45% соответственно). Последующее изучение биологической активности и физико-химических свойств кораллана выявило его два существенных недостатка: высокая вязкость растворов и наличие алергизирующего

фактора (белковый компонент - до 15% от состава препарата). Мы предприняли попытку уменьшить вышеназванные негативные эффекты, тем более, это важно, поскольку кораллан проходит предклинические испытания в Национальном институте онкологии и радиологии (Гавана, Куба).

Для снижения вязкости водного раствора препарата, последний обрабатывали ультразвуком в токе аргона на диспергаторе УЗДА-21. Удаление белкового компонента осуществляли посредством двукратной обработки препарата. Содержание моносахаридов в модифицированной форме кораллана соответствовало 49,8%; белка - 1,5%. По данным гельфильтрации, ультрацентрифугирования, метилирования каких-либо изменений в химической структуре углеводного компонента кораллана не отмечалось. Модифицированный таким образом кораллан был назван коралланом-М.

Нужно отметить, что ультразвуковая обработка кораллана приводит к снижению его токсичности: ЛД<sub>50</sub> уменьшилась с 560 мг/кг до 980 мг/кг. Как следует из результатов, приведенных в таблице 12, кораллан-М оказывает противоопухолевое действие, сопоставимое с действием исходной формы кораллана. Более того, с уменьшением вязкости раствора оказалось возможным введение кораллана-М внутривенно. В последнем случае также отмечен противоопухолевый эффект.

Учитывая малую токсичность кораллана (ЛД<sub>50</sub> - 560 мг/кг) и его оптимальные лечебные дозы, составляющие  $1/10$  и  $1/20$  от ЛД<sub>50</sub> можно предполагать, что механизм противоопухолевого действия этого биополимера лежит в активизации собственных защитных сил организма - опухоленосителя. Действительно, в экспериментах *in vitro* кораллан не оказывал прямого ингибирующего действия на опухолевые клетки и обнаруживал противоопухолевую активность при профилактическом введении, то есть до прививки опухолевого материала.

Модификация кораллана повлияла на его иммуномодулирующие свойства, что выражалось в снижении способности стимулировать антителиобразование, розеткообразование. Тем не менее прежние показатели степени макрофагальной инфильтрации карциномы Эрлиха (табл.11) сохранились. Снижение показателей иммунологической реактивности, скорее всего, связано с элиминацией белкового компонента биополимера, являющегося антигенным раздражителем, способным влиять на иммунологический статус организма. Поскольку снижение иммуномодулирующих свойств у кораллана-М не отражается на значениях его противоопухолевой активности, вполне вероятно, что иммунологические реакции организма не являются единственной составляющей в механизме противоопухолевого действия кораллана.

Таблица 11.

Влияние кораллана и кораллана-М на степень инфильтрации карциномы Эрлиха

Воздействие	Доза мг/кг интервал (час) x количество введений	Количество мигрировавших клеток при РСМЛК (M ± m)	
		общее количество	макрофаги
Кораллан	50/24 x 5	678 ± 59 P<0,05	142 ± 16 P<0,01
Кораллан-М	50/24 x 5	563 ± 42	125 ± 12 P<0,05
Контроль	-	447 ± 51	73 ± 15

Примечание: РСМЛК - реакция спонтанной миграции лимфорециркуляционных клеток.

К особенностям химической структуры полисахаридного компонента кораллана следует отнести сульфатированную связь, делающую биополимер труднодоступным для переваривающих ферментов ретикулоэндотелиальной системы организма. Данное

обстоятельство следует учитывать при обсуждении механизма действия кораллана, поскольку трудноперевариваемые биополимеры при попадании в кровоток и депонируясь в органах, богатых ретикулоэндотелиальными элементами, могут выступать в качестве чрезвычайных неантгенных раздражителей, приводящих, в конечном итоге, к стимуляции неспецифической (стрессовой) реактивности организма. В свете современных представлений последствиями таких событий выступает повышение резистентности (устойчивости) организма к различным неблагоприятным факторам, в том числе противостоянии опухолевому процессу. Важным критерием повышения противоопухолевой устойчивости организма является доза неспецифического (полиспецифического) раздражителя: дозы, приводящие к физиологическому стрессу, являются оправданными при вмешательстве в злокачественный процесс, а дозы запороговые - только усугубляют его.

Проведенные нами исследования гистологической структуры паренхимы печени (орган богатый ретикулоэндотелиальными элементами) у животных, получавших кораллан, выявили активизацию и пролиферацию купферовских клеток. Наблюдалось также увеличение количества гранулем, нарастание двуядерных и полиплоидных гепатоцитов, что отражает активность регенеративных процессов и является компенсаторной реакцией на гибель гепатоцитов. Обнаруживаются пикнотические ядра, деструкция, кариорексис и кариолизис. Наблюдаемая гистологическая картина подтверждает, что кораллан в используемых при лечении дозах является чрезвычайным раздражителем, приводящим к компенсаторно-реактивным изменениям в печени организма-опухоленосителя.

Суммируя полученные результаты, можно заключить, что механизм противоопухолевого действия кораллана лежит в комплексе реактивных изменений организма, включающих в себя иммуномодуляцию, усиление степени макрофагальной инфильтрации опухолевого очага и активизацию РЭС. Естественно, при малой массе опухоли это могло бы привести к полному контролю за злокачественным процессом. Однако большинство опухолей достигают большой массы раньше, чем складывается максимум напряжения неспецифической реактивности организма, тем более, что сама опухоль также является встречным реактивным фактором, могущим нарушить сложившийся положительный реактивный потенциал.

### **ПРОИЗВОДНЫЕ ХИТООЛИГОСАХАРИДОВ**

**Противоопухолевая иммуномодуляция.** Цель создания производных хитоолигосахаридов (путем избирательного ацилирования аминогрупп, содержащихся в молекуле хитоолигосахарида) заключалась в получении новых водорастворимых и малотоксичных противоопухолевых соединений указанного класса (источник получения - хитин краба). Нами установлено, что ЛД<sub>50</sub> для новых производных хитоолигосахаридов составляет соответственно, мг/кг: № 1-92; № 2-98; № 3-98; № 4-99; № 5-100. Таким образом все исследуемые препараты производных хитоолигосахаридов имеют ЛД<sub>50</sub> в пределах 92-100 мг/кг и могут быть отнесены в разряд малотоксичных соединений.

Все исследуемые соединения были испытаны на противоопухолевую активность. Из результатов, приведенных в таблице 12, видно, что наиболее активным является производное хитоолигосахаридов под № 1.

Таблица 12.  
Противоопухолевая активность производных хитоолигосахаридов при асцитной карциноме Эрлиха

Воздействие	Число мышей	Разовая доза мг/кг, интервал (час) x число введений	СПЖ мышей в сутках	УПЖ % к контролю
Контроль	12	-	19,4 ± 2,2	-
Хитоолигосахарид № 1	10	60/24 x 5	36,6 ± 2,5*	188
№ 2	10	60/24 x 5	26,9 ± 2,2	138
№ 3	10	60/24 x 5	26,8 ± 3,6	138
№ 4	10	60/24 x 5	29,1 ± 2,7	144
№ 5	10	60/24 x 5	27,3 ± 3,3	140

Примечание: УПЖ - увеличение продолжительности жизни мышей по сравнению с контролем.

\* - < 0,05.

Из представленных данных в таблице 13 можно сделать вывод, что механизм противоопухолевого действия производных хитоолигосахаридов лежит в их способности усиливать продукцию интерлейкина-1 и фактора некроза опухолей, синтез которых прямо коррелирует с торможением опухолевого роста.

Таблица 13.  
Индукция интерлейкина-1 (ИЛ-1) и фактора некроза опухолей (ФНО) производными хитоолигосахаридов

Производные хитоолигосахаридов (ПХ)	ИЛ-1 <sup>а</sup>	ФНО <sup>б</sup>	ФНО <sup>в</sup>
№ 1	2,03	54,9	н.п.*
№ 2	2,36	45,1	76,5
№ 3	4,24	34,9	н.п.
№ 4	1,37	35,9	н.п.
№ 5	2,98	32,1	н.п.
Контроль (физиол. р-р)	-	-	-

а - индекс стимуляции при дозе ПХ 10 мкг/мл;

б - цитотоксический индекс при дозе ПХ 10 мкг/мл;

в - цитотоксический индекс ПХ, введенных мышам (доза 2,5 мг/кг); сыворотка крови мышей была испытана в титре 1/4.

\* н.п. - испытания не проводились.

### **ФУКОИДАН**

**Антибактериальная и иммуномодулирующая активность.** Большую актуальность приобретают вопросы совершенствования средств и методов коррекции вторичных иммунодефицитных состояний, сопровождающих инфекционные заболевания. В условиях лекарственной устойчивости возбудителей использование традиционных средств терапии зачастую не дает эффекта и сопровождается при этом целым спектром побочных явлений, включая аллергию и иммунодепрессию при введении антибиотиков и вакцин. В связи с этим особую актуальность приобретает разработка и изучение препаратов с ассоциированной антибактериальной и иммуномодулирующей активностью.

Исследования показали, что все тестируемые бактерии проявляют высокую чувствительность к действию фукоидана. В течение первых 15 мин контакта взвеси исследуемых микроорганизмов с фукоиданом от 20±4,1% до 90±7,5% теряют жизнеспособность. В этот период бактерицидные свойства препарата в большей степени

выражены по отношению к *E.coli* и *Y.pseudotuberculosis*. Через 2 ч контакта погибают практически все *Y.pseudotuberculosis*, *E.coli* и *S.typhimurium*. При взаимодействии фукоидана с *S.aureus* число выживших бактерий снижается до  $15 \pm 2,4\%$ . Следует отметить, что полученный эффект является результатом истинной бактерицидной активности фукоидана, так как снижение жизнеспособности бактерий, которое могло бы иметь место благодаря флокуляции, невозможно из-за энергичного встряхивания фукоидан-бактериальной смеси перед высевом на среду.

Установив наличие антимикробных свойств у фукоидана, мы исследовали протективное действие препарата при профилактическом введении мышам, зараженных *S.enteritidis*. Выживаемость мышей, которым вводили фукоидан, в конце срока наблюдения (21 сутки) составила 60-70% в зависимости от используемой концентрации препарата, тогда как в контрольной группе все животные погибали. В следующей серии экспериментов были изучены иммуномодулирующие свойства фукоидана. С этой целью оценивалось влияние препарата на реакции гуморального и клеточного иммунитета, а также факторы неспецифической, в частности, фагоцитарной активности клеток перитонеальной полости и лейкоцитов крови животных. Установлено, что введение 0,1 мл 0,25% раствора фукоидана за сутки до иммунизации мышей эритроцитами барана увеличивает количество антителообразующих клеток в селезенке ( $68484 \pm 674$ ) по сравнению с контролем ( $40468 \pm 385$ ). Исследование влияния фукоидана на формирование гиперчувствительности замедленного типа показало, что введение препарата за сутки до инъекции сенсибилизирующей дозы эритроцитов барана сопровождается усилением кожных проявлений реакции: процент прироста массы лапки мышей опытной группы составляет 185% по отношению к контролю, что свидетельствует о его влиянии на функциональную активность предшественников Т-эффекторов ГЗТ. При изучении влияния фукоидана на фагоцитарные процессы было показано, что парентеральное введение препарата за сутки до заражения животных *S.enteritidis* в дозах, вызывающих быстро развивающийся инфекционный процесс ( $10^9$  м.к.л.), приводит к значительному усилению интенсивности и завершенности фагоцитоза в полиморфноядерных лейкоцитах (ПМЯЛ). Как видно из рис.10, у мышей, получивших фукоидан, уже через 3 ч отмечается интенсивная миграция клеточных элементов в брюшную полость (содержание ПМЯЛ в экссудате опытных мышей составляет  $80 \pm 5,2\%$ , в контроле -  $15 \pm 2,1\%$ ). Высокий уровень фагоцитирующих клеток сохраняется в течение всего периода наблюдения (24 ч), обеспечивая интенсивный фагоцитоз микроорганизмов. Этим же объясняются более низкие показатели числа микроорганизмов, поглощаемых одним лейкоцитом, у стимулированных мышей. Следствием этого процесса является снижение числа внеклеточно расположенных микроорганизмов, вплоть до полного их исчезновения уже через 9 ч после заражения, завершение процесса фагоцитоза в лейкоцитах и полное очищение брюшной полости через 15 ч. Наряду с этим отмечается выраженная макрофагальная реакция экссудата опытных мышей, сочетающаяся с увеличением числа жизнеспособных клеток. В то же время у контрольных животных показатели обсемененности экссудата остаются высокими до конца периода наблюдения.

Следует отметить, что используемая экспериментальная система не дает возможности выяснить, как изменяется при введении препарата процесс поглощения микроорганизмов. Для решения этого вопроса мы использовали систему, в которой оценивали влияние фукоидана на фагоцитарную активность лейкоцитов крови морской свинки в условиях *in vitro*. При этом была подобрана такая доза микроорганизмов, при которой как в контроле, так и в опыте число фагоцитирующих клеток было примерно одинаковым (60-70%). В этих условиях отмечено достоверное увеличение процесса

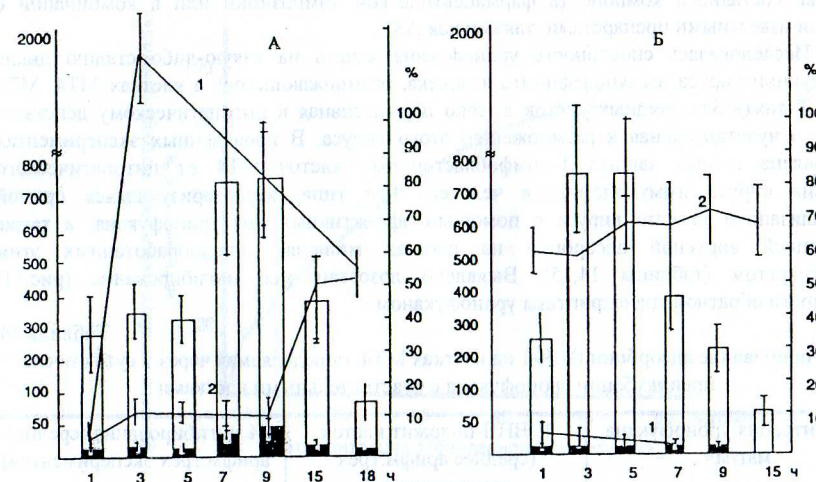


Рис.10. Влияние фукоидана на фагоцитарную активность клеток перитонеальной полости мышей, зараженных *S.enteritidis*.

А - контрольная группа животных ( без введения фукоидана); Б - опытная группа животных.

По оси абсцисс - время после заражения, ч; по осям ординат: слева - количество микроорганизмов, справа - количество клеток (%).

1 - количество внеклеточно расположенных микроорганизмов;

2 - процент полиморфноядерных лейкоцитов в экссудате брюшной полости мышей.

Светлые столбики - процент фагоцитирующих клеток;

Темные столбики - количество микроорганизмов, поглощенных одним фагоцитом.

поглощения микроорганизмов фагоцитами стимулированных животных, выражающееся в увеличении фагоцитарного числа и завершенности фагоцитоза.

Таким образом, проведенные исследования показали способность фукоидана в значительной степени подавлять рост грамположительных и грамотрицательных микроорганизмов *in vitro*, а при введении *in vivo* стимулировать иммунные реакции гуморального и клеточного типа, включая процессы фагоцитоза. Полученные результаты открывают возможность дальнейшего изучения фукоидана в качестве препарата с ассоциированной антибактериальной и иммуномодулирующей активностью.

## УРОНОФУКАН

**Влияние на ВИЧ-инфекцию и развитие вирусиндуцированного лейкоза Раушера.** Исследовалось влияние сульфатированного олигосахарида уронофукана (полученного из бурой водоросли *Laminaria japonica*) на ВИЧ-1 индуцированную цитопатогенность в условиях *in vitro*, где основная мишень  $T4^+$ -клетки обрабатывались различными дозами этого биопрепарата. Цитотоксичность уронофукана *in vitro* на клетках MT4 и H9 не проявлялась даже при концентрациях выше 5000 мкг/мл в сравнении с прототипным фукоиданом, для которого 50% цитотоксическая доза, определяемая по выживанию клеток MT4 равна  $1060 \pm 210$  мкг/мл или с азидотимидином (АЗТ, Sigma), который был токсичен в концентрации, превышающей 1000 мкг/мл. Таким образом, уронофукан может быть использован как в виде самостоятельной формулы, так и в

качестве составного компонента фармацевтической композиции или в комбинации с другими известными препаратами, такими как АЗТ.

Исследовалась способность уронофукана влиять на какую-либо стадию цикла репродукции вируса иммунодефицита человека, размножающегося в клетках МТ4. МТ4 линия Т-лимфобластоидных клеток высоко перmissive к цитопатическому действию ВИЧ-1 и чувствительная к размножению этого вируса. В проведенных экспериментах установлена полная защита Т-лимфобластоидных клеток МТ4 от цитопатического действия вируса иммунодефицита человека I-го типа, характеризующаяся прямой нейтрализацией *in vitro* вируса с помощью эффективных доз уронофукана, а также ингибированием вирусной адсорбции на клетках мишенях, предобработанных этим биопрепаратом (таблицы 14,15). Выявлено дозозависимое ингибирование (рис.11) активности обратной транскриптазы уронофуканом.

Таблица 14.

Ингибирование адсорбции ВИЧ-1 на клетках МТ4, определяемая через 7 суток после преинкубации уронофукана с чувствительными клетками

Концентрация уронофукана, мкг/мл	% ВИЧ-положит. клеток (среднее арифм. трех экспериментов)	% ингибирования (среднее арифм. трех экспериментов)
10	0	100
1	0	100
0,5	0	100
0,25	49,0 ± 0,5	50
0,1	53,2 ± 0,3	48
Контроль без обработки уронофуканом	96,4 ± 1,3	-

Серьезным ограничением на пути использования сульфатированных полисахаридов является их высокая антикоагуляционная активность. Мы установили, что антикоагуляционный эффект уронофукана был более, чем в 10 раз ниже, чем у гепарина. Если 50% значение для анти-ВИЧ активности на клетках МТ4 перевести из мкг/мл в ед/мл, получим следующие значения, ед/мл: уронофукан  $6,7 \times 10^{-3}$ ; фукоидан  $3,6 \times 10^{-3}$ ; гепарин  $1 \times 10^{-3}$ . Таким образом, уронофукан обладает анти-ВИЧ активностью при концентрациях более, чем в 100 раз низких, чем его антикоагуляционная активность.

Таблица 15

Нейтрализация ВИЧ-1 с помощью преинкубации бесклеточного вируса с уронофуканом, определяемая на 7 сутки в клетках МТ4

Концентрация уронофукана, мкг/мл	% ВИЧ-положит. клеток (среднее арифм. трех экспериментов)	% ингибирования (среднее арифм. трех экспериментов)
10	0	100
1	0	100
0,5	0	100
0,25	39,6 ± 0,4	57,6
0,1	67,8 ± 0,6	29,3
Контроль без обработки уронофуканом	96,4 ± 1,3	-

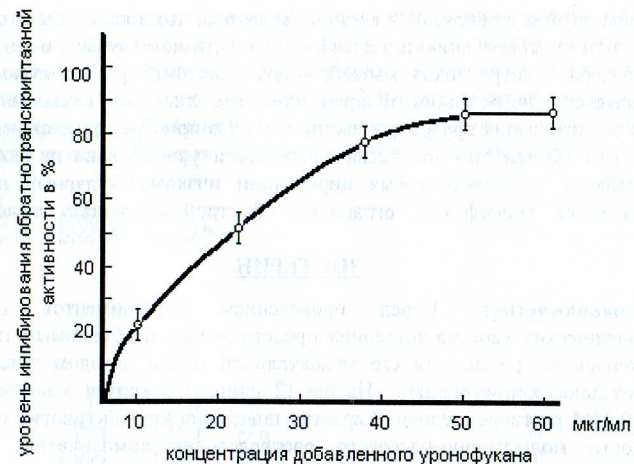


Рис 11. Уровень ингибирования активности обратной транскриптазы уронофуканом

При изучении ингибирующего влияния уронофукана на развитие вирусиндуцированного лейкоза Раушера исследуемый олигосахарид (в дозе 1 мг/мышь) вводили внутривентриально ежедневно в течение 5 дней. При введении уронофукана с профилактической и лечебной целью было показано, что предварительное применение этого биопрепарата тормозило гибель мышей на ранних сроках наблюдения (таблица 16), однако к 50-у дню эта разница стиралась. Терапевтический эффект (введение уронофукана после введения вируса лейкоза Раушера) у этого олигосахарид отсутствовал. Сходные данные были получены при изучении влияния уронофукана на биосинтез вируса лейкоза Раушера у мышей. Предварительное введение биопрепарата статистически значимо подавляло синтез вируса (lg титра вируса в опытной группе 2,833, в контрольной 4,38). Применение уронофукана с лечебной целью не влияло на титр вируса лейкоза Раушера (lg титра 4,0 и 4,33 соответственно).

Судя по литературным данным (Sugawara et al., 1989), сульфатированные фукозосодержащие полисахариды вмешиваются в процессы лиганд-рецепторных

Таблица 16.

Динамика гибели мышей при использовании различных схем введения уронофукана, %

Схема введения препарата	Дни после введения вируса лейкоза Раушера (ВЛР)					
	30	40	45	50	55	60
Внутрибрюшинно до введения ВЛР	4,5	13,6	13,6	68,18	86,36	86,36
Внутрибрюшинно после введения ВЛР	27,3	40,9	68,2	86,4	86,4	95,5
Контрольная группа (введение ВЛР)	19	47,6	66,7	66,7	71,4	80,95



взаимоотношений между вирусом и клеткой-мишенью, что в конечном итоге приводит к ослаблению или ингибированию потенций вируса, в данном случае, по-видимому, вируса лейкоза Раушера. Эритролейкоз мышей, индуцированный ретровирусами Раушера и Френда, является многостадийным процессом, где лишь на самых поздних этапах происходит малигнизация проэритробластов и лейкоз приобретает клональный характер. Вероятно, этим объясняется отсутствие активности уринофукана на поздних стадиях развития лейкоза, поскольку время циркуляции низкомолекулярных полисахаридов, каковым является уринофукан, ограничено быстрой скоростью выведения их из организма.

### ЗОСТЕРИН

**Фармакокинетика.** Перед проведением экспериментов по изучению фармакокинетических свойств зостерина представлялось необходимым предварительно оценить степень гетерогенности его молекулярной массы методом гель-проникающей распределительной хроматографии. На рис.12 приведена кривая элюции исследуемого пектина в 0,05M растворе щелочи. Характер поведения кривой говорит о значительной гетерогенности молекулярно-массового распределения компонентов, составляющих зостерин. При этом часть препарата (приблизительно 15-20%) имеет молекулярную массу в пределах 10 кДа. Как следует из ранее опубликованных данных, средняя молекулярная масса зостерина варьирует в пределах 70-80 кДа. Такие расчеты исследуемого нами зостерина дают сходную величину и представляют собой грубое отражение общей картины распределения компонентов препарата по молекулярной массе, располагающихся в широком пределе от менее 10 до более 100 кДа. Полученные данные позволяют легче интерпретировать в дальнейшем фармакокинетические и биологические свойства исследуемого препарата.

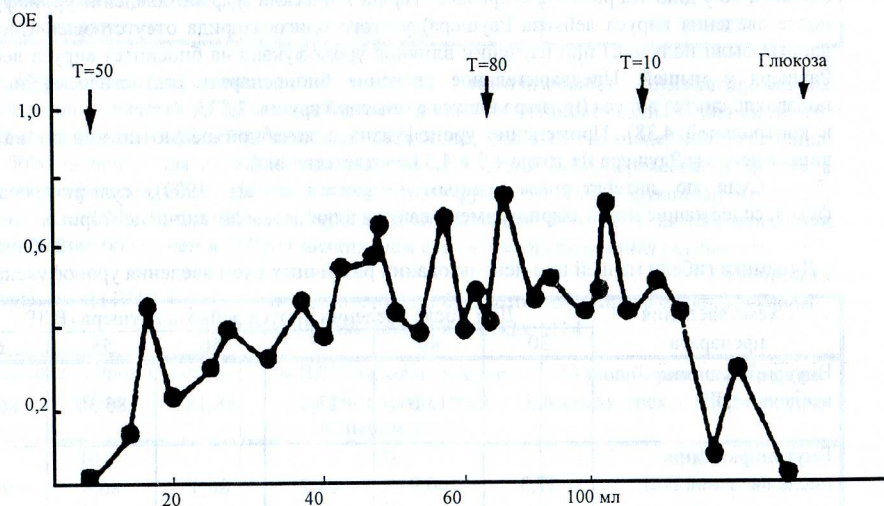


Рис. 12. Молекулярно-массовое распределение зостерина.

Примечание: ОЕ - оптические единицы;

Т - молекулярная масса декстрана.

Как известно, эффективность биологического действия вещества в значительной

мере обусловлена его биодоступностью. Проведенный нами анализ поступления  $^3\text{H}$ -зостерина и его метаболитов в кровяное русло и ткани органов показал постепенный характер всасывания в желудочно-кишечном тракте незначительной части метки (до 20%) с последующим постепенным ее выведением. Динамика распределения радиоактивности по органам и тканям представлена на рис.13. Следует отметить относительно равномерное распределение метки между кровью, печенью, почками, легкими и селезенкой.

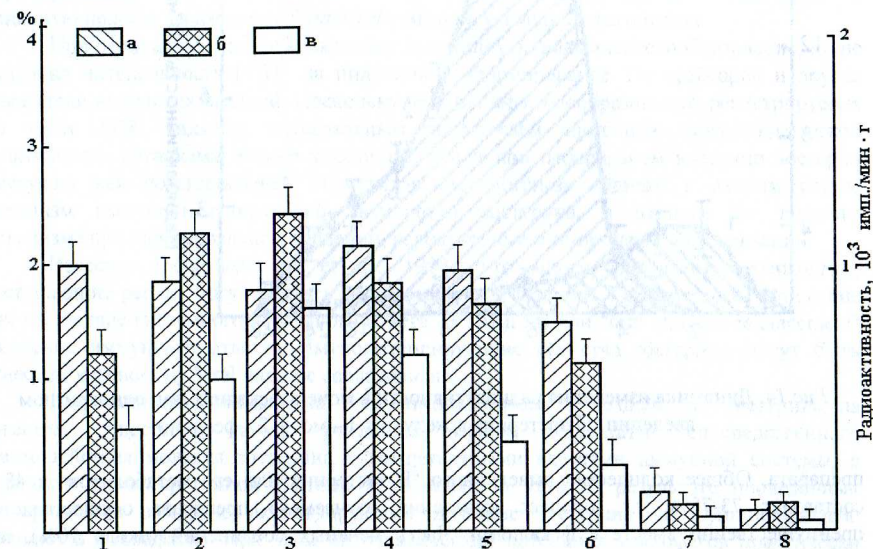


Рис. 13. Динамика распределения радиоактивности по органам и тканям при однократном введении  $^3\text{H}$ -зостерина в желудок:

1 - кровь, 2 - печень, 3 - почки, 4 - легкие, 5 - селезенка, 6 - сердце,  
7 - скелетная мышца, 8 - головной мозг.

Усл.обозн.: а - 1 ч; б - 2 ч; в - 4 ч.

Максимальное содержание метки через 1 ч зарегистрировано в крови, легких и селезенке, а через 2 ч в печени и в почках. Включение метки в печень и почки сменяется довольно интенсивным снижением радиоактивности, что, несомненно, связано с экскреторной функцией этих органов. Относительно низкие удельные активности отмечены в сердце и скелетной мышце. Обращает на себя внимание низкое содержание радиоактивности в головном мозге, что предполагает слабое проникновение  $^3\text{H}$ -зостерина и его метаболитов через гематоэнцефалический барьер.

На рис.14 приведены данные, иллюстрирующие динамику выведения радиоактивности с мочой и фекалиями. Можно видеть, что максимальный уровень радиоактивности в моче наблюдается через 2 ч после введения меченого препарата в желудок, а после 3 ч имеет место относительно быстрое его снижение. За 24 ч суммарный уровень выведения радиоактивных метаболитов с мочой составил 12-15% от введенной первоначально. Параллельно с изучением выведения  $^3\text{H}$ -зостерина с мочой определяли содержание меченых соединений в фекалиях. Как видно из того же рисунка, выведение

радиоактивности с фекалиями достигает максимума примерно через 6 ч после введения

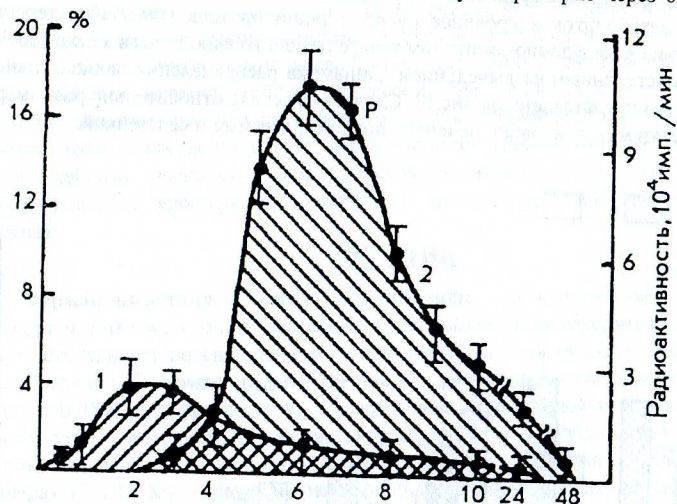


Рис. 14. Динамика изменения радиоактивности в моче и фекалиях при однократном введении  $^3\text{H}$ -зостерина в желудок: 1 - моча, 2 - фекалии.

препарата. Общее количество выведенного  $^3\text{H}$ -зостерина или его метаболитов за 48 ч составляет 73-78%, т.е. процесс выведения изучаемого препарата осуществляется преимущественно вместе с фекалиями. Часть меченых соединений (около 10%), по-видимому, теряется в виде продуктов ферментативной деградации в толстой кишке, а именно: летучих жирных кислот, газов и энергии, поглощаемой микрофлорой толстой кишки. Через 48 ч практически вся введенная с препаратом метка выводится из организма, аккумуляции радиоактивности в исследуемых органах и тканях не наблюдается.

Принято считать, что пектины резистентны к гидролизу ферментами пищеварительного тракта человека, но подвержены разрушению микрофлорой толстой кишки. Согласно современным представлениям, в тонкой кишке возможно всасывание не только мономеров, но и высокомолекулярных комплексов, в частности, поли- и олигосахаридов (Moffat, 1986).

Полученные нами результаты указывают на возможность всасывания по крайней мере низкомолекулярных фрагментов (в пределах 10 кДа) зостерина или его метаболитов в тонкой кишке. Кроме того, выявленные закономерности фармакокинетики изучаемого пектина из морской травы позволяют более объективно осмысливать результаты исследования его биологической и фармакологической активности.

**Иммуномодулирующая активность.** Оценку иммуномодулирующего влияния зостерина на организм экспериментальных животных осуществляли при двух маршрутах введения: парентеральном и пероральном. В первом случае были получены следующие результаты:

- зостерин стимулирует иммунные реакции гуморального и клеточного типа: а) увеличивает число АОК в селезенках мышей (в 2,6 раза); б) усиливает интенсивность

реакции ГЗТ (в 1,5-2 раза); в) индуцирует спонтанную пролиферацию спленоцитов мышей;

- зостерин оказывает угнетающее влияние (максимальное снижение супрессии в 6,5 раз) на индукцию и формирование специфических Т-супрессоров, а также снижает функциональную активность зрелых супрессорных клеток;

- парентеральное введение зостерина сопровождается лейкоцитарной реакцией периферической крови, усилением миграции полиморфноядерных лейкоцитов в брюшную полость зараженных *S. enteritidis* мышей, усилением фагоцитоза.

При пероральном способе введения зостерин усиливал антителообразование, но не влиял на интенсивность РГЗТ, на индукцию и формирование Т-супрессоров и другие показатели иммунных реакций. Поскольку реакция антителообразования, регистрируемая по числу АОК, является интегральным показателем состояния иммунологической реактивности организма, можно заключить, что и при пероральном введении зостерин выступает как потенциальный стимулятор иммуногенеза. Однако в данном случае механизм иммуностимулирующей активности зостерина, в отличие от такового механизма при парентеральном введении, вероятно, имеет иной характер реализации.

Известно (Murofushi M. et al., 1986), что многие антигены и митогены, поступающие per os, могут вызвать так называемый феномен "oral tolerance" (снижение или отсутствие системного иммунного ответа на антиген) или "oral immune enhancement" (усиление иммунного ответа). Иммунопотенцирующие свойства зостерина могут быть отнесены к феномену "oral immune enhancement".

Для понимания механизма иммуномодулирующего воздействия зостерина на организм существенно важно учитывать, каковы результаты непосредственного взаимодействия молекул зостерина с компетентными клетками иммунной системы, в частности в изолированной системе в условиях *in vitro*. В результате проведенных экспериментов выявлено активизирующее действие зостерина на функциональную активность макрофагов. При этом цитотоксический потенциал макрофагов практически не зависит от используемого диапазона доз (400, 200, 100, 50 мкг/мл). Зостерин обладает заметной митогенной активностью в пределах концентраций от 50 до 400 мкг/мл инкубационной среды. При концентрации 200 мкг/мл индекс стимуляции достигает наибольшей величины, равной 3,8. Широко используемый неспецифический митоген КонА оказался более эффективным индуктором бластогенеза (ИС=11,6). Вместе с тем при сочетанном действии различных доз зостерина и КонА (10 мкг/мл) имеет место снижение интенсивности включения  $^3\text{H}$ -тимидина в лимфоциты мышей по сравнению с лимфоцитами, обработанными только КонА (рис.15). Эффект более выражен при сочетании КонА с оптимальной митогенной дозой зостерина - 200 мкг/мл. Возможно, это вызвано конкурентным взаимоотношением в ходе взаимодействия зостерина и КонА с рецепторами плазматических мембран лимфоцитов, что в свою очередь может препятствовать реализации митогенного действия КонА. С другой стороны, поскольку связывание митогенов, в том числе КонА, с поверхностью лимфоцитов сопровождается усилением включения ионов кальция, которое рассматривают как сигнал запуска ранних биохимических реакций активизации лимфоцитов, не исключено, что связывание полианиона-зостерина *in vitro* с  $\text{Ca}^{++}$  может вносить определенные коррективы в индукцию пролиферативного ответа лимфоцитов.

Полученные данные свидетельствуют о том, что иммуномодулирующие свойства зостерина во многом зависят от непосредственного контактного взаимодействия его молекул с иммунокомпетентными клетками организма.



Рис. 15. Активизация лимфоцитов селезенки мышей зостерином в присутствии (А) и в присутствии (В) Конд. Дозы зостерина: 1 - 400 мкг/мл, 2 - 200, 3 - 100, 4 - 50.

**Противовирусная активность.** В данной серии экспериментов изучали противовирусную активность при непосредственном взаимодействии *in vitro* зостерина и патогенных штаммов вирусов (Пол Ц, Адено 7, КА 7, КВ 2). В целях сравнительного анализа ингибирующего действия зостерина параллельно в эксперименте использовали полигалактуроновою кислоту (ПГУ) - продукт кислотного гидролиза зостерина.

Было установлено, что зостерин и ПГУ в дозе 100 мкг/мл и выше защищают клетки от цитопатогенного действия вирусов. При обсуждении механизма противовирусного действия зостерина и ПГУ нужно обратиться к их структурным особенностям. К структурным особенностям зостерина следует отнести наличие олигосахаридных фрагментов: нейтральных сахаров, присоединенных к полигалактуроновым цепям и определяющих пространственную организацию этого биополимера. ПГУ получали в процессе кислотного гидролиза зостерина, разрушая боковые цепи нейтральных сахаров, но сохраняя цепи полигалактуроновой кислоты. Низкая степень этерификации и значительное количество свободных карбоксильных групп придают молекулам зостерина и ПГУ сильный отрицательный заряд. Известно (Вава М. et al. 1988), что многие полианионные высокомолекулярные соединения, как природные, так и синтетические, обладают противовирусной активностью, реализуя свой эффект путем предотвращения адсорбции вируса на клетку. Не исключено, что аналогичный механизм противовирусного эффекта зостерина и ПГУ лежит в адсорбционных свойствах их молекул.

**Антибактериальная активность.** Исследовалась кинетика антибактериальной активности зостерина по отношению к некоторым грамотрицательным и грамположительным микроорганизмам, а также оценка влияния препарата на устойчивость животных к экспериментальной инфекции.

Все тестируемые бактерии проявляют высокую чувствительность к действию зостерина (рис. 16). Следует отметить, что полученный эффект является результатом действия истинной бактерицидной активности зостерина, так как снижение жизнеспособности бактерий, которое могло бы иметь место благодаря флокуляции, невозможно из-за энергичного встряхивания зостерин-бактериальной смеси перед определением числа выживших микроорганизмов.

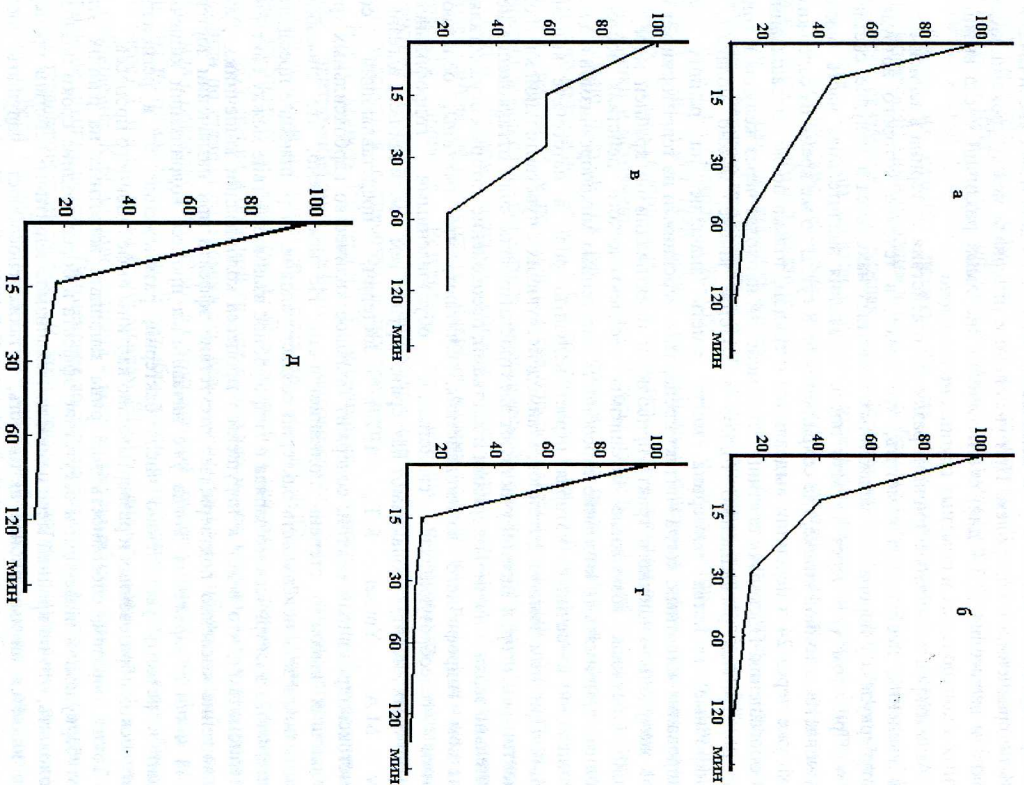


Рис. 16. Антимикробная активность зостерина. По оси абсцисс - время контакта зостерина с микроорганизмами, мин; по оси ординат - количество колоний, % к контролю. а - *Урсидолибергелис*, б - *S.aureus*, в - *P.aeruginosa*, г - *E.coli*, д - *S.furiosus*.

После установления антимикробных свойств у зостерина была исследована его терапевтическая активность при лечении мышей, пероральное заражение которых *Урсидолибергелис* моделировало естественное течение инфекции.

При анализе полученных данных обращает на себя внимание тот факт, что интенсивность действия зостерина зависит от времени его введения в организм относительно момента заражения. Наиболее выраженную устойчивость к заражению *Урсидолибергелис* наблюдали при назначении зостерина одновременно и через 24 ч

после инфицирования. В этом случае количество выживших животных увеличивалось на 30-40% по сравнению с контролем. При увеличении интервала между сроками введения зостерина и заражения (2,3,4 дня) статистически значимых различий числа выживших животных в контрольных и опытных группах не выявлено.

Анализируя возможные причины различного действия зостерина в зависимости от сроков введения, необходимо отметить, что время, в течение которого возбудитель псевдотуберкулеза у перорально зараженных животных находится в желудке, составляет 24-28 ч. При этом уже через 15 мин после заражения значительная часть бактерий обнаруживается в тонкой кишке, где сохраняется до 8 сут. В то же время из содержимого желудка уже через 24 ч йерсинии выделяются с трудом, только после подрашивания на средах обогащения. Поскольку пектины без изменений проходят через желудок и тонкую кишку, подвергаясь расщеплению только в толстой кишке, можно полагать, что антимикробные свойства зостерина могут иметь значение на ранних этапах инфицирования животных, когда контакт препарата с йерсиниями на территории верхних отделов желудочно-кишечного тракта приводит к инактивации по крайней мере части бактерий. Обсуждая возможные механизмы терапевтического действия зостерина, необходимо принимать во внимание способность патогенных микроорганизмов к адгезии и колонизации кишечника, которая играет ведущую роль в патогенезе кишечных инфекций. При этом помимо адгезинов, взаимодействующих с чувствительной клеткой по типу лектин-рецептор, в адгезии участвуют электростатические силы отталкивания между отрицательно заряженными бактериями и клетками, преодоление которых осуществляется посредством гидрофобного взаимодействия. Считают, что пектины, обладающие высокими гелеобразующими свойствами, обусловленными гидрофильностью галактуроновых кислот, оболочкаивают бактерии, нарушая тем самым процесс адгезии (E.-Nakeev M.A., Yousef R.T., 1970). Зостерин, представляющий собой низкометоксилированный пектин, содержит большое количество карбоксильных групп, определяющих высокую степень полианионности. Не исключено, что способность зостерина покрывать поверхность бактерий создает условия, затрудняющие преодоление отрицательного электрического заряда и гидрофобное взаимодействие между бактериями и эпителиоцитами, что ведет к нарушению процесса колонизации кишечника. Данное предположение косвенно подтверждает отсутствие эффекта при назначении зостерина через 48 ч после заражения, когда уже начавшийся процесс колонизации кишечника приводит к резкому увеличению числа бактерий, размножению их в регионарных лимфатических образованиях и развертыванию картины инфекционного процесса.

Таким образом, способность зостерина защищать животных на ранних этапах псевдотуберкулезной инфекции и отсутствие эффекта в более поздние сроки позволяют предположить, что по крайней мере одним из механизмов защитного действия препарата *in vivo* является антимикробная активность, а также способность нарушать процесс колонизации эпителия кишечника йерсиниями.

**Противоопухолевая, модифицирующая и антимагистатическая активность.** При пероральном способе введения зостерин обнаруживает ингибирующее действие в отношении солидной карциномы Эрлиха, где максимум торможения роста опухоли составляет 57%. Поскольку противоопухолевые полисахариды, как правило, опосредуют свое действие через эндогенные реакции организма-опухоленосителя, в частности иммунные, мы провели оценку влияния зостерина на иммунологическую реактивность мышей, пораженных опухолевым процессом. Как оказалось, зостерин увеличивает содержание антителообразующих клеток в селезенке у животных-опухоленосителей в 2 раза, что свидетельствует о повышении иммунологической реактивности. В пользу суждения об опосредованном (через эндогенные реакции организма-опухоленосителя)

действию свидетельствует и тот факт, что в условиях *in vivo* ни в одной из используемых доз (вплоть до 1000 мкг/мл) зостерин не оказывает прямого цитотоксического действия на опухолевые клетки Эрлиха.

Одним из главных препятствий на пути современной противоопухолевой (цитостатической) химиотерапии выступают побочные токсико-метаболические эффекты, в частности, связанные с повреждающим действием на слизистую желудочно-кишечного тракта. Одним из таких агентов выступает известный антимагистат 5-фторурацил (5-ФУ). Его токсическое действие, приводящее к гибели животных, сопровождается повреждением тонкого отдела кишечника.

При оценке модифицирующего влияния было установлено, что зостерин увеличивает среднюю продолжительность жизни опытных животных на 30% и снижает процент летального исхода на 20-30%. У мышей, не получавших зостерин при введении летальной дозы 5-ФУ (450 мг/кг), интоксикация сопровождалась диареей, причем в отдельных случаях геморрагического характера. При вскрытии регистрировалось вздутие тонкой кишки и истончение ее стенки. В свою очередь у мышей параллельной группы, дополнительно получавших раствор зостерина, не было отмечено признаков диареи. Противоопухолевая активность 5-ФУ соотносится с таковой при совместном применении 5-ФУ и зостерина. В эксперименте четко прослеживается защитный эффект зостерина в отношении лейкопоза - показателя биологической реактивности у животных, леченых 5-ФУ. Таким образом зостерин, снижая токсическое действие 5-ФУ на организм опухоленосителя, не препятствует ингибирующему воздействию последнего на развитие опухолевого процесса. Результаты проведенного исследования указывают на перспективность изучения модифицирующих свойств зостерина с целью уменьшения побочного действия противоопухолевых препаратов.

Вирус лейкоза Раушера (ВЛР) индуцирует у взрослых мышей чувствительных линий эритро-лимфомиелоз, сопровождающийся спленомегалией. При внутрибрюшинном введении зостерина до введения ВЛР (с профилактической целью) отмечалась значительная задержка гибели мышей от лейкоза по сравнению с контрольной группой. Заболевание в опытной группе протекало менее тяжело, чем в контрольной, о чем судили по степени спленомегалии. Масса селезенки у погибших мышей в опытной группе была в пределах 400-500 мг, а в контрольной группе у мышей, погибших в эти же сроки, она достигала 850-1000 мг. Внутрибрюшинное введение зостерина с лечебной целью (через 3 дня после введения мышам ВЛР) усиливает гибель мышей в первые 45 дней наблюдения. К 60-му дню разница в количестве погибших животных в опытной и контрольной группах исчезла. Применение зостерина *per os* по схеме после введения ВЛР оказывает терапевтический эффект. В этой группе животных отмечалось значительное замедление гибели мышей в период всего срока наблюдения. Степень спленомегалии также была в 2-2,5 раза ниже, чем в контрольной группе. Таким образом, пероральное применение зостерина оказывает лечебный эффект на развитие хронического лейкоза Раушера у мышей. Предварительное внутрибрюшинное введение зостерина снижало титр ВЛР до  $10^{-2,625}$  (в контроле  $10^{-4,33}$ ). Также отмечали снижение титра ВЛР при пероральном введении препарата до  $10^{-3,166}$ .

При обсуждении возможного механизма действия зостерина в первую очередь необходимо учитывать его адсорбционные свойства. По данным фармакокинетики  $^3\text{H}$ -зостерина, вводимого животным *per os*, последний обнаруживается практически во всех тканях и органах организма. Естественно предположить, что молекулы зостерина, распределяясь с током биологических жидкостей по организму, могут адсорбировать вирус лейкоза Раушера или же препятствовать его адсорбции на поверхностных структурах клеток-мишеней. Известно, что факторами, ответственными за

восприимчивость к экзогенным вирусам и влияющим на экспрессию онкогенного потенциала вирусного генома, выступают изменения в липидном составе крови и в системе иммунологического надзора. Как было установлено, зостерин, адсорбируя часть холестерина, нормализует липидный метаболизм у экспериментальных животных, а также выступает в качестве эффективного иммуномодулятора, способного стимулировать реакции клеточного и гуморального иммунитета и в то же время оказывать угнетающее влияние на индукцию и формирование специфических Т-супрессоров. Не исключено, что именно полифункциональный характер воздействия зостерина на организм является ведущим фактором, препятствующим становлению вирусиндуцированного процесса.

Метастазирование злокачественных опухолей является многозвеньевым процессом, патогенетический механизм которого еще недостаточно изучен. Имеются сообщения о модифицирующем влиянии некоторых полисахаридов на процессы метастазирования как в эксперименте, так и в клинических наблюдениях. Интерес к полисахаридам обусловлен в первую очередь отсутствием их токсического влияния на организм, хорошей переносимостью, а также нормализующим и стимулирующим действием.

В наших исследованиях было установлено, что вводимый *per os* зостерин снижает число метастазов карциномы Льюис и карциномы Эрлиха в легких. Однако при карциноме Эрлиха антиметастатический эффект был несколько выше, что выразилось в снижении частоты метастазирования и уменьшении среднего диаметра самих метастазов. Анализ лейкограмм выявил возрастание числа моноцитов у контрольных групп животных как при карциноме Льюис, так и карциноме Эрлиха. Данный феномен, очевидно, обусловлен степенью выраженности метастатического поражения легких, поскольку моноцитоз нередко сопутствует патологическим изменениям в последних.

Таким образом, установлено, что зостерин при пероральном способе введения оказывает модифицирующее влияние на процессы диссеминации опухолевых клеток в организме животных.

**Радиозащитная и антигеморрагическая активность.** Зостерин применяли в течение 5 дней (начиная за 24 ч до облучения) в виде 0,5%-ного раствора в поилках (*ad libitum*). В параллельных опытах использовали комбинации зостерина с кверцетином (витамин Р, уменьшающий проницаемость и ломкость капилляров) и водно-спиртовым экстрактом женьшеня. Конечная концентрация в питьевой воде и растворе зостерина официального препарата кверцетина составила 50 мг на 100 мл. Женьшень использовали в конечном разведении 1:100.

Установлено, что как раздельное, так и комбинированное применение указанных препаратов повышало выживаемость животных к летальному R-облучению (6 Гр). При летальном облучении наибольшую эффективность (рис.17) показала комбинация зостерина, кверцетина и женьшеня. Судя по тому, что парные сочетания зостерин+кверцетин, зостерин+женьшень также обнаруживают суммационный эффект, можно говорить о способности зостерина оптимизировать действие указанных веществ. В перспективе это свойство зостерина может оказаться полезным в выборе адекватных комбинаций фитосредств для достижения максимального радиозащитного эффекта.

Поскольку одной из ведущих причин летального исхода у облученных животных выступает кишечное кровотечение (геморрагия), можно было предположить, что зостерин в силу особенностей своей структуры и биологической активности (например, противоязвенной) реализует свое радиозащитное действие, препятствуя развитию геморрагического процесса. В целях выяснения этого предположения проведено тестирование зостерина на антигеморрагическую активность.

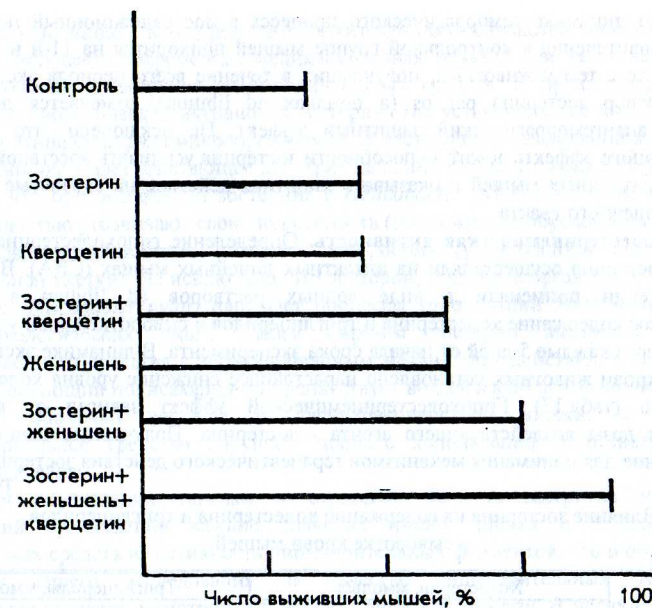


Рис.17. Радиозащитное действие зостерина и его комбинированных форм при летальном облучении (6 Гр) у мышей.

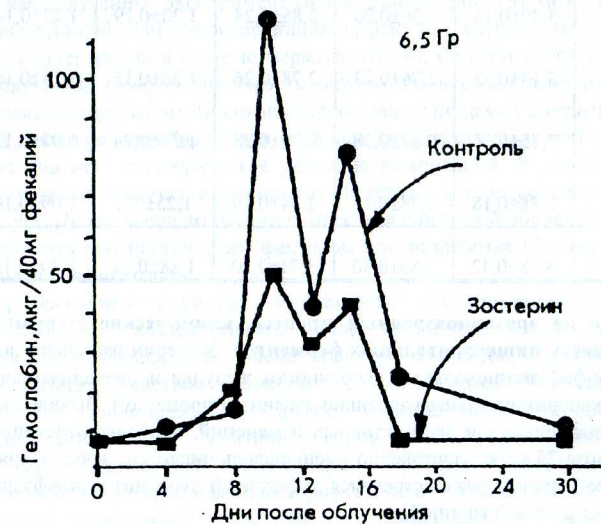


Рис.18. Защитный антигеморрагический эффект зостерина при облучении у мышей.

Судя по динамике геморрагического процесса в пострadiационный период пик кишечного кровотечения в контрольной группе мышей приходится на 11-й и 15-й день (рис.18). Вместе с тем у животных, получавших в течение всего периода эксперимента 0,5%-ный раствор зостерина per os (в поилках ad libitum), отмечается достаточно выраженный антигеморрагический защитный эффект. Не исключено, что механизм воспроизведенного эффекта лежит в способности зостерина усиливать восстановительные процессы у облученных мышей и оказывать защитное действие на слизистые оболочки желудочно-кишечного тракта.

**Гипохолестеринемическая активность.** Определение гипохолестеринемической активности зостерина осуществляли на интактных линейных мышцах (СВА). В опытных группах зостерин применяли в виде водных растворов ad libitum в поилках. Количественное содержание холестерина и триглицеридов в сыворотке крови у животных определяли через каждые 5 дней от начала срока эксперимента. В динамике эксперимента в сыворотке крови животных установлено нарастающее снижение уровня холестерина и триглицеридов (табл.17). Гипохолестеринемический эффект зависел от временной экспозиции и дозы воздействующего агента - зостерина. Полученные данные имеют важное значение для понимания механизмов терапевтического действия зостерина.

Влияние зостерина на содержание холестерина и триглицеридов в сыворотке крови мышей

Воздействующий агент	Холестерин, ммоль/л			Триглицериды, ммоль/л		
	Время, дни					
	5	10	15	5	10	15
Зостерин, 0,1%-ный р-р	3,51±0,26	3,30±0,27	3,32±0,29	1,25±0,21	1,26±0,18	1,19±0,08
Зостерин, 0,3%-ный р-р	3,30±0,15	3,36±0,20	2,86±0,24	1,20±0,19	1,22±0,14	1,15±0,09
Зостерин, 0,5%-ный р-р	3,14±0,35	2,76±0,23	2,78±0,26	1,26±0,15	1,18±0,16	1,10±0,17
Зостерин, 0,7%-ный р-р	3,15±0,24	2,67±0,18	2,70±0,28	1,28±0,24	1,07±0,11	0,85±0,14
Зостерин, 1%-ный р-р	2,88±0,18	2,78±0,15	2,74±0,19	1,25±0,1;	1,09±0,10	0,87±0,06
Контроль (вода)	3,78±0,42	3,66±0,30	3,74±0,20	1,38±0,14	1,39±0,15	1,38±0,11

**Влияние на эрозивноязвенный процесс, клинические штаммы *Helicobacter pylori* и активность пищеварительных ферментов.** Зостерин оказывает нормализующее влияние на морфофункциональные особенности желудка и двенадцатиперстной кишки белых крыс с экспериментальным эрозивно-язвенным процессом. Выявлено существенное снижение воспалительных и деструктивных изменений, наиболее отчетливо выраженное при суточной дозе 75 мг/кг: достоверно уменьшалось число язв, кровоизлияний и эрозий. У животных этой группы реже встречался диффузный дуоденит и диффузный гастрит по сравнению с контрольной группой.

*Helicobacter pylori* обнаруживают у больных хроническими гастритами (60-90%), язвой желудка (40-70%) и двенадцатиперстной кишки (70-90%). *Helicobacter pylori* находятся в слое слизи над клетками желудочного эпителия или на самих клетках в своей

"экологической нише" и повреждают архитектуру слизистой оболочки желудка. Именно в этой связи современная медикаментозная терапия при заболеваниях данного генеза учитывает применение антибактериальных средств. В предыдущем изложении материала о биологической активности зостерина мы установили его антибактериальное действие в отношении ряда микроорганизмов. В настоящем исследовании мы установили, что зостерин оказывает угнетающее действие на клинические штаммы *Helicobacter pylori*. Показано, что при экспозиции зостерина с *Helicobacter pylori* последние уже через 3-5 минут полностью утрачивают свою подвижность (подвижность обусловлена движением 4-5 жгутиков, расположенных у одного или обоих (у делящихся клеток) полюсов бактериальной клетки). Не исключено, что зостерин, попадая в организм, с первых минут контакта с *Helicobacter pylori* нарушает процессы колонизации этим микроорганизмом своих "экологических ниш". Таким образом зостерин выступает в качестве противоязвенного средства с ассоциированным механизмом действия: с одной стороны, как гелеобразующий полисахарид он препятствует воздействию агрессивных факторов на слизистые оболочки желудка и двенадцатиперстной кишки, с другой, как антибактериальное средство нарушает процесс колонизации патогенетических ниш *Helicobacter pylori*.

При определении тактики и стратегии лечения гастритов или язвенных заболеваний существенно важное значение имеют знания о характере влияния используемых средств на активность пищеварительных ферментов, что и определило цель и задачу нашего исследования. В качестве пищеварительных тест-ферментов использовали трипсин, химотрипсин, пепсин, липазу и амилазу. В целях сравнительного изучения применяли цитрусовый пектин. Поскольку зостерин является естественным низкометоксилированным пектином, то для сравнительной оценки влияния на активность пищеварительных ферментов были использованы две формы цитрусового пектина - низкометоксилированная (НМЦП) и высокометоксилированная (ВМЦП).

Учитывая полученные экспериментальные данные (рис. 19), можно заключить, что фермент-ингибирующий, или стимулирующий эффект исследуемых пектиновых веществ зависит от их концентрации в системе фермент-пектин, степени метоксилированности и источника получения. Особую значимость результаты исследования приобретают при составлении пектинсодержащих биологически активных пищевых композиций, поскольку некоторые из пектинов, ингибируя или усиливая активность того или иного фермента, могут сводить "на нет" специфическое действие композиций. В нашем исследовании, например, цитрусовые пектины, в отличие от зостерина, усиливают активность пепсина, т.е. способны усугублять воспалительные процессы в слизистой оболочке желудка, что по сути может служить прогностическим фактором при разработке биологически активных композиций на основе пектинов.

**Геропротекторные свойства.** Современная экспериментальная геронтология располагает немногими воздействиями, пролонгирующими жизнь. Одно из них - энтеросорбция, заключающаяся в приеме вовнутрь сорбентов, ослабляющих в генезе старения нарастающее действие интоксикационных влияний. В эксперименте кроме зостерина были использованы и другие морские полисахариды, обладающие сорбиционными свойствами - альгинат натрия (полисахарид бурых водорослей), каррагинан (сульфатированный полисахарид красных водорослей). Препараты полисахаридов давали в виде водных растворов (0,5%) в поилках ad libitum в течение 5 сут с последующими перерывами - 10 сут. Это приводило к увеличению средней продолжительности жизни опытных животных на 36,6% в случае назначения зостерина, 18,6% - каррагинана и 29,4% - альгината натрия. Исследуемые полисахариды оказывали

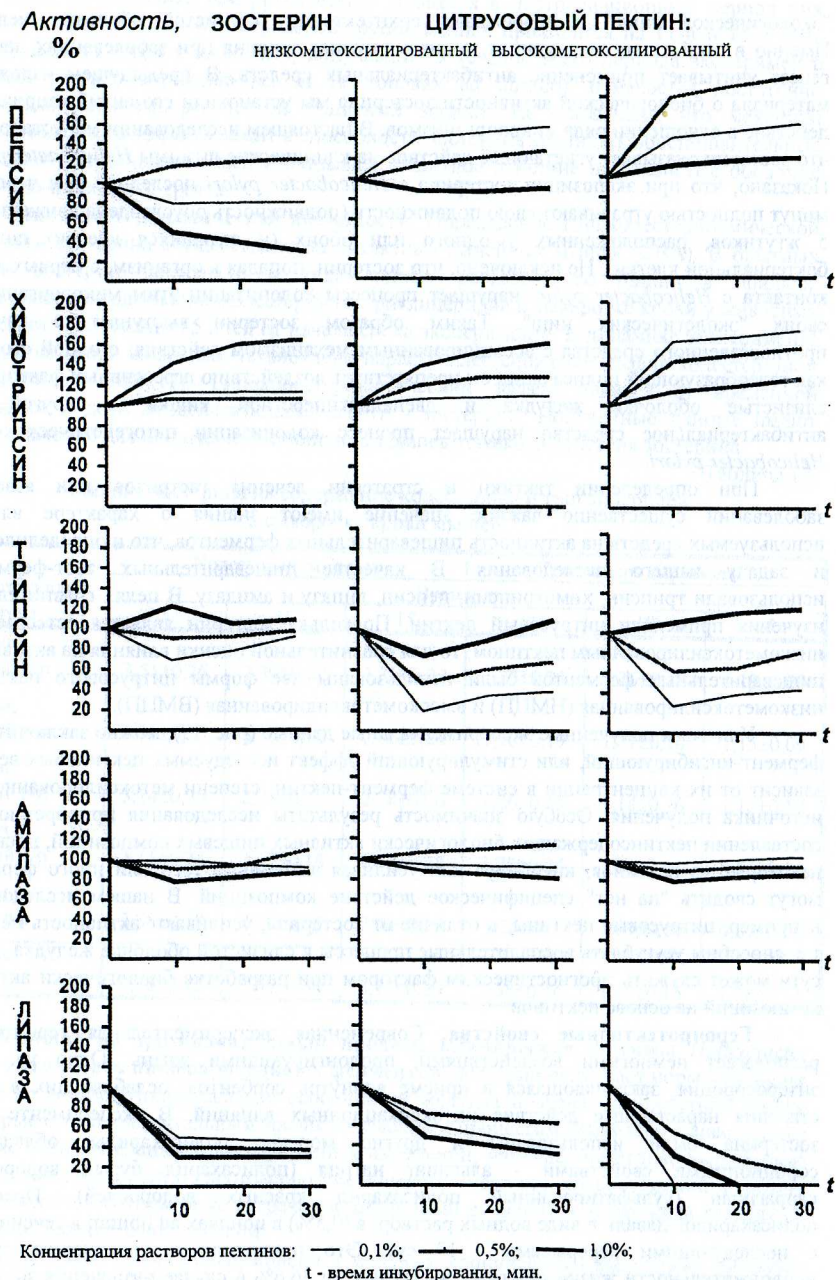


Рис. 19. Влияние пектинов на ферментативную активность пищеварительных ферментов.

нормализующее влияние на липидный метаболизм у старых животных, что, по-видимому, обусловлено адсорбцией и выведением данными биополимерами части холестерина и желчных кислот. Возможно, оптимизация доз полисахаридов и режимов их применения будет способствовать большему пролонгированию жизни животных, однако уже полученные данные свидетельствуют о том, что полисахариды морских трав и водорослей представляют интерес как потенциальные геропротекторные средства.

**Антидотная активность.** Исследования показали, что содержание полигалактуроновой кислоты в различных образцах зостерина колеблется в пределах от 68% до 81%. Это связано, в первую очередь, с местом сбора сырья (морской травы сем. *Zosteraceae*) и, соответственно, временем года (сезона). Для отбора наиболее адекватного образца зостерина, мы исследовали металлосвязывающие свойства. Как видно из таблицы 18, сорбционная способность зостерина *in vitro* в отношении всех металлов находится в прямо пропорциональной зависимости от содержания в нем полигалактуроновой кислоты. При определении антидотной активности зостерина *in vivo* мы использовали образец №3, т.е. образец с содержанием полигалактуроновой кислоты - 81%.

В результате проведенных исследований установлено, что длительное введение свинца приводит к интенсивному его накоплению в органах и тканях мышц. При этом содержание свинца в организме и экскрементах мышей резко возрастало уже в первые 10 дней с начала опыта. Зостерин и цитрусовый пектин полностью не предотвращают, но существенно и, как отмечено, в разной степени снижают накопление свинца во внутренних органах и костях животных (рис.20). Основными мишенями накопления свинца в организме являются костная ткань, почки и печень. В данном случае зостерин по своему антидотному действию существенно превосходит цитрусовый пектин. Полученные данные подтверждают, что основным путем выведения свинца из организма при связывании его с пектиновыми веществами является желудочно-кишечный тракт. Однако при выделительной терапии зостерином и цитрусовым пектином отмечена и определенная роль почек в экскреции свинца из организма животных. Из результатов проведенных испытаний можно заключить, что зостерин активно способствует связыванию и выведению свинца из организма животных. В то же время анализ полученных результатов показывает, что зостерин по сравнению с цитрусовым пектином обладает более широким спектром антиотоксического действия при свинцовом отравлении в эксперименте.

Таблица 18.

№ образца зостерина	Содержание полигалактуроновой кислоты, %	Количество связанного металла, мг				
		Ca	Cu	Zn	Cd	Pb
1	68	68,5	113	116	193	356
2	74	75,4	120	122	209	392
3	81	87,0	138	144	241	451

С целью дальнейшей оптимизации антидотных свойств зостерина нами были исследованы его солевые формы: аммонийная, натриевая и калиевая. В данном варианте эксперимента в отличие от предыдущего оценку антидотного действия зостерина и его солевых форм осуществляли на 25 день от начала эксперимента. Установлено (рис.21),

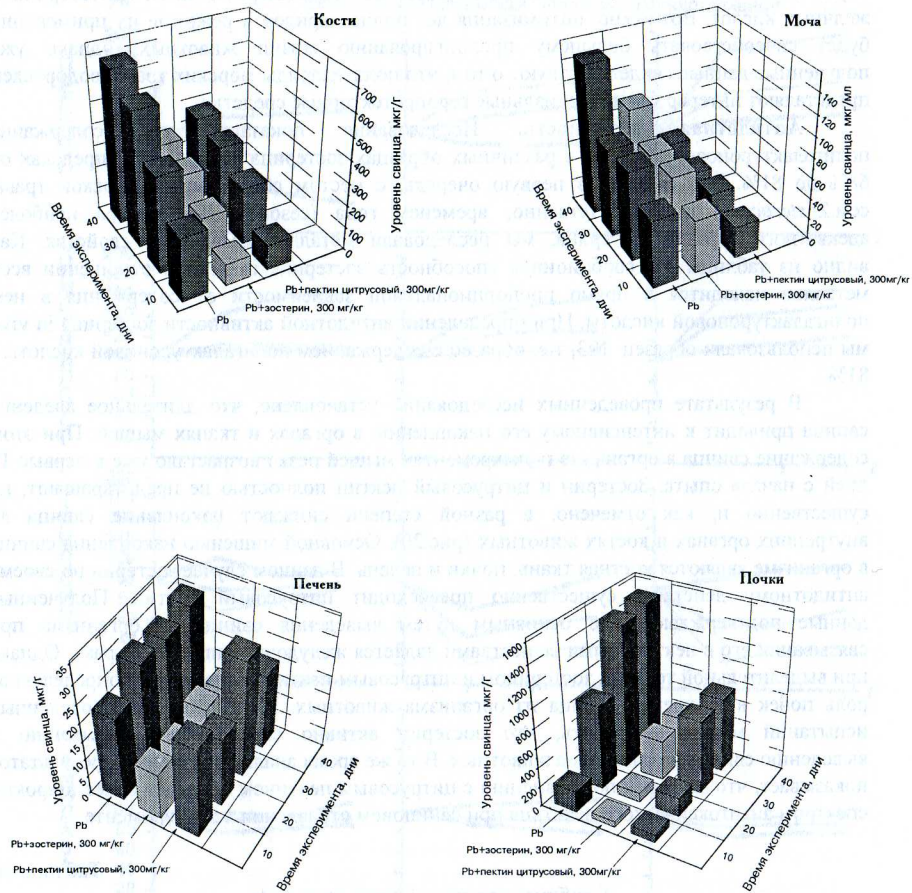
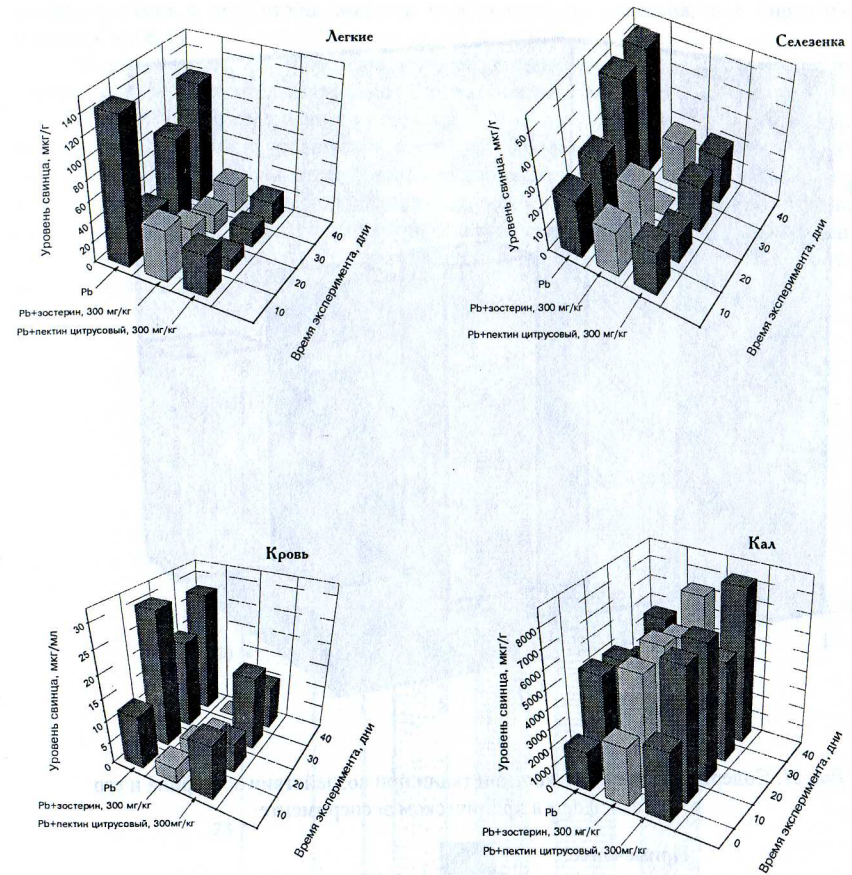


Рис.20. Содержание свинца в биосубстратах при воздействии зоостерина в хроническом эксперименте



Продолжение Рис.20.



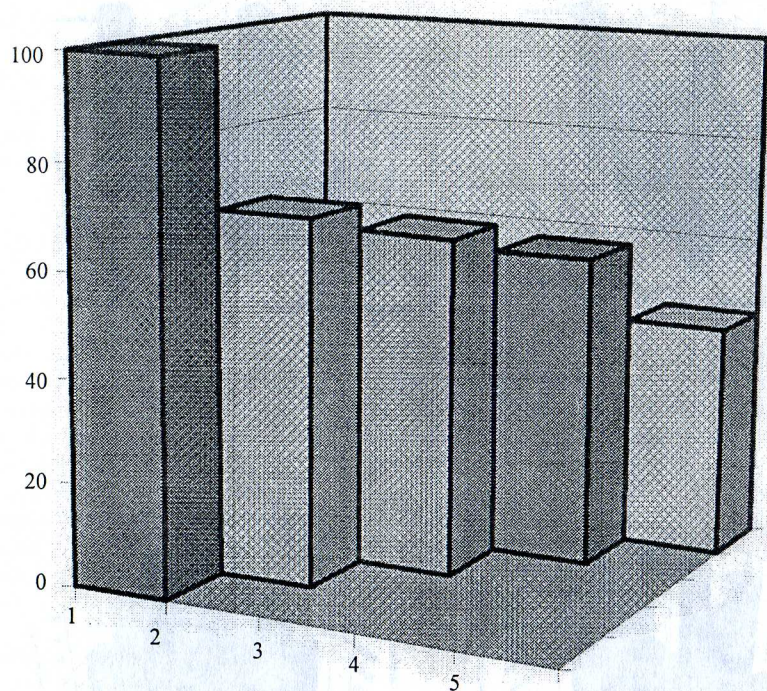


Рис.21. Содержание свинца в костной ткани при воздействии зостерина и его солевых форм в хроническом эксперименте.

Примечание:

- 1 - контроль - свинец;
- 2 - свинец + зостерин;
- 3 - свинец + зостерат натрия;
- 4 - свинец + зостерат калия;
- 5 - свинец + зостерат аммония.

что все три солевые формы зостерина существенно снижают накопление свинца в костях (главное депо накопления свинца в организме). Наибольшим антидотным действием обладает аммонийная соль зостерина, которая оказалась эффективнее натриевой и калиевой солей. Несолевая форма зостерина (зостерин) менее эффективна, чем все

исследуемые солевые формы. Таким образом, солевые формы зостерина должны быть тщательно исследованы на биодоступность, токсичность и по другим физиологическим характеристикам с тем чтобы выявить особенности их действия, как биологически активных веществ.

В другой серии экспериментов изучали декорпорирующее действие зостерина на модели свинцового носительства (животные, получавшие свинец до введения зостерина).

При сравнении содержания свинца в кости у контрольных животных и животных, получавших зостерин, установлено, что максимум декорпорирующего действия достигается при использовании 0,5%-ного раствора зостерина (рис.22). Повышение дозы зостерина не приводит к усилению декорпорирующего действия. Полученные результаты имеют существенно важное значение, поскольку зостерин может быть использован как антидотное средство, не только блокирующее всасывание свинца, но и способствующее выведению его депонированных форм.

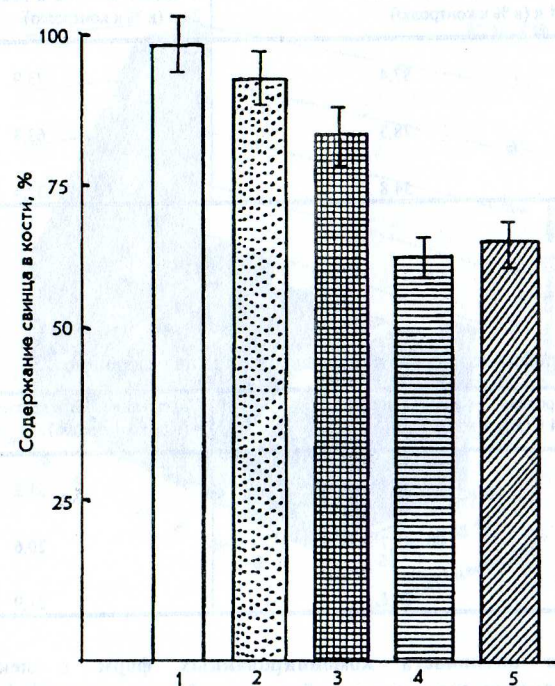


Рис.22. Декорпорирующее действие зостерина на модели свинцового носительства. Содержание свинца в кости: 1 - инкорпорированного (контроль свинцового носительства); 2 - при естественной декорпорации; 3 - при индуцированной декорпорации 0,1%-ным раствором зостерина; 4 - то же 0,5%-ным раствором зостерина; 5 - то же 1%-ным раствором зостерина.

**Антидотные (радиозащитные) свойства при радионуклидной интоксикации в эксперименте.** Из более чем 200 радионуклидов - продуктов деления урана и плутония - наибольшую опасность представляют изотопы иода, цезия и стронция. Предотвращение

или снижение поступления их в организм - важная радиационно-гигиеническая проблема. Профилактика внутреннего облучения сводится к разработке мер и способов снижения всасывания радионуклидов в желудочно-кишечном тракте или ускорения выведения изотопов с мочой и калом. Мы исследовали профилактическое влияние зостерина на резорбцию радиоактивного цезия ( $^{137}\text{Cs}$ ) и стронция ( $^{89}\text{Sr}$ ) из желудочно-кишечного тракта. Критерием оценки служил уровень накопления радионуклидов в крови и костной ткани экспериментальных животных (табл. 19 и 20).

Судя по уровню накопления  $\text{Cs}^{137}$  и  $\text{Sr}^{89}$  в крови и костной ткани у экспериментальных животных, зостерин блокирует всасывание радионуклидов. При этом наблюдается дозозависимый эффект растворов зостерина.

Таблица 19.

Профилактическое влияние зостерина на резорбцию  $^{137}\text{Cs}$ 

Вещество	Уровень $^{137}\text{Cs}$ в крови после 24 ч (в % к контролю)	Содержание $^{137}\text{Cs}$ в костной ткани после 24 ч (в % к контролю)
0,1% раствор зостерина	87,4	73,9
0,5% раствор зостерина	78,3	63,3
1% раствор зостерина	54,8	32,4

Таблица 20.

Профилактическое влияние зостерина на резорбцию  $^{89}\text{Sr}$ 

Вещество	Уровень $^{89}\text{Sr}$ в крови после 24 ч (в % к контролю)	Содержание $^{89}\text{Sr}$ в костной ткани после 24 ч (в % к контролю)
0,1% раствор зостерина	80,5	51,2
0,5% раствор зостерина	43,7	20,6
1% раствор зостерина	24,1	21,9

**Антидотная активность комбинированных форм с лекарственными растениями.** Для оценки антидотного действия комбинированных форм зостерина с лекарственными растениями использовали модель экспериментального свинцового отравления. Критерием отбора лекарственных растений служили их специфические целебные свойства, могущие способствовать снижению общей интоксикации организма. В этом отношении наибольший интерес представили следующие виды лекарственных растений: боярышник кроваво-красный *Crataegus sanguinea* Pall - плоды; володушка многожилчатая *Vupleurum multinerve* DC. - трава; леспедеца копеечниковая *Lespedeza hedysaroides* (Pall) Kitag. - трава; лимонник китайский *Schisandra chinensis* (Turcz.) Bail - плоды; солодка уральская *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. - корень; элеутерококк колючий *Eleutherococcus senticosus* (Rupr. et Maxim.) Maxim. - корень.

Как следует из полученных данных (рис.23.), используемые комбинации зостерина с лекарственными растениями не снижали основного антидотного эффекта зостерина, а в случае сочетания последнего с володушкой, леспедецей, солодкой наблюдалась тенденция к его усилению. Существенно важным фактором, сопровождающим детоксицирующее действие комбинированных форм зостерина, выступает положительная модуляция иммунологической реактивности. На 10-й день наблюдения эффект усиления иммунологической реактивности наблюдался при использовании комбинации зостерин+володушка. Наиболее значимый эффект положительной модуляции (на 30-й день эксперимента) был присущ следующим комбинациям: зостерин+володушка, зостерин+солодка. На 40-й день хронического эксперимента практически все комбинации зостерина с лекарственными растениями приводили в той или иной степени к усилению иммунологической реактивности организма (в 2-2,5 раза).

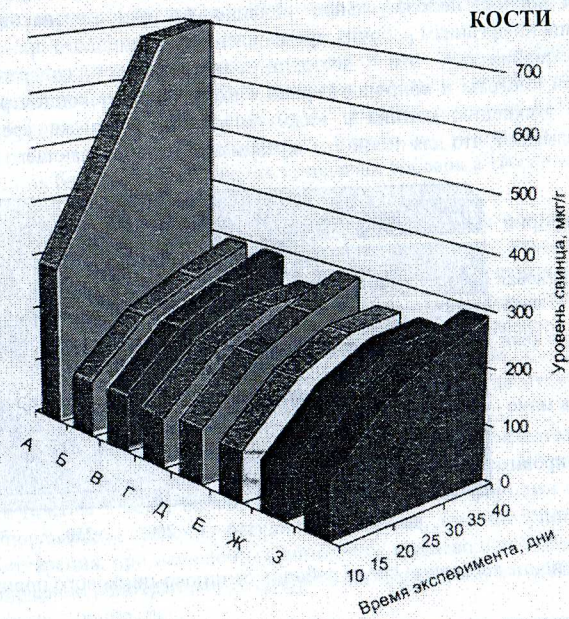


Рис. 23. Влияние комбинированных форм зостерина на содержание свинца:

- А - свинец, Б - свинец+зостерин, В - свинец+зостерин+боярышник,
- Г - свинец+зостерин+володушка, Д - свинец+зостерин+лимонник,
- Е - свинец+зостерин+солодка, Ж - свинец+зостерин+леспедеца,
- З - свинец+зостерин+элеутерококк.

При изучении декорпорирующего действия комбинированных форм зостерина на модели свинцового носительства также не отмечено снижения его активности, а такие комбинации, как зостерин+володушка и зостерин+лимонник, усиливали декорпорирующий эффект зостерина.

**Применение антидотной терапии на производстве Усть-Каменогорского свинцово-цинкового комбината.** Проведенные биохимические исследования у обследованных рабочих позволили установить, что содержание свинца в крови (от 0,2 до 0,5 мг/л), моче (0,45-1,5 ммоль/л) и кале (60-240 ммоль/кг) в 5-12 раз выше предельных границ общепринятых норм. Обнаружено также значительное повышение уровня дельта-аминолевулиновой кислоты в моче (30-40 ммоль/г креатинина), что в сочетании с высоким содержанием копропорфирина в моче (320-480 ммоль/г креатинина в сутки) позволило констатировать наличие скрытых форм свинцовой интоксикации. Зостерин применяли в виде 1%-ного водного раствора (200 мл) внутрь 1 раз в день утром натощак за 15-20 мин до еды. У всех рабочих в начале наблюдений, через 12 дней и в конце наблюдений определяли уровень свинца в крови, моче и кале, а также содержание дельта-аминолевулиновой кислоты и копропорфирина в моче (наиболее показательные признаки свинцовой интоксикации).

Обобщая полученные результаты (рис.24), можно заключить, что зостерин оказывает существенное положительное влияние на ряд признаков токсического воздействия свинца на организм рабочих промышленного свинцового производства. Объективно установлено, что зостерин нормализует содержание дельта-аминолевулиновой кислоты и копропорфирина в моче, снижает концентрацию свинца в крови, повышая экскрецию свинца с калом и мочой. В то же время результаты наблюдений показывают, что для полной эвакуации свинца, поступающего в организм в

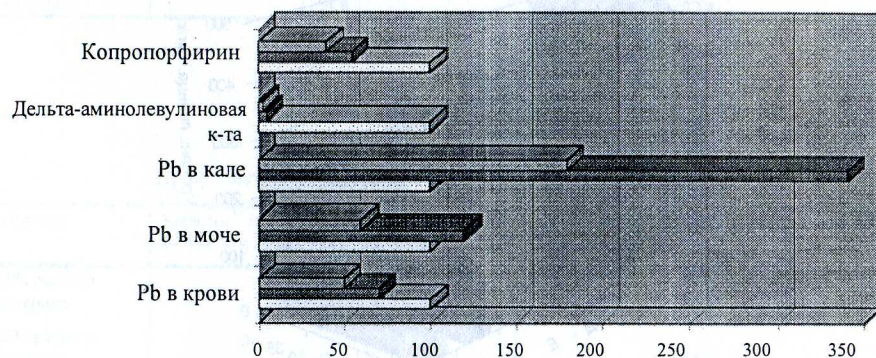


Рис.24. Применение зостерина среди рабочих свинцово-цинкового производства.

условиях промышленного производства, объективно необходим более длительный (а по возможности - постоянный) прием безвредных средств выделительной терапии, каким может служить нетоксичный морской пектин - зостерин.

**Комбинированные формы зостерина в парафармации.** В последние годы в лечебно-профилактическом питании все в большем объеме используются биологически активные вещества. Этот динамический процесс обусловлен прежде всего более глубоким пониманием сути физиологических потребностей человека в питании (от рождения до глубокой старости) в разных климатических, трудовых и других условиях.

Применение новых, безвредных биологически активных добавок представляет не только теоретический, но и практический интерес. Их наличие позволяет расширить ассортимент и повысить биологическую ценность пищевых продуктов, придать им определенную направленность, а также изменить структуру потребления пищевых

продуктов населением в соответствии с известными теориями сбалансированного и адекватного питания. Задача создания такого рода специализированных лечебно-профилактических (парафармацевтических) пищевых добавок может быть решена путем разработок и применения технологий с целью придания таковым новых качеств или усиления имеющихся целебных свойств. Биологически активные добавки, аккумулируя в небольшом объеме высокую биологическую активность, способны влиять на глубинные обменные процессы. Малая энергетическая ценность зостерина (42 ккал) при его высокой биологической активности делает эти добавки особенно значимыми для больных ожирением, где использование многих пищевых веществ лимитируется уровнем их энергетической емкости. Широкое распространение избыточной массы тела (ИМТ) и ожирения в нашей стране (более 50% населения), частое сочетание ИМТ с такими тяжелыми заболеваниями, как атеросклероз, ишемическая болезнь сердца (ИБС), артериальная гипертензия (АГ), сахарный диабет и др., позволяет рассматривать использование этих добавок не только как один из способов терапевтического воздействия при ожирении, но и как метод лечения и профилактики сопутствующих ему заболеваний.

Приведем характеристику разработанных нами двух комбинированных форм зостерина, выступающих в качестве пищевых добавок лечебно-профилактического свойства: сухой формы - таблетки "Гербамарин" (HERBA-растение; MARINUS - морской) и жидкой формы - напиток "Флора-Вита". Апробация указанных пищевых добавок осуществлялась на базе клиники по оценке пищевых добавок в Институте питания РАМН г.Москвы.

Пищевая добавка "Гербамарин" представляет собой композицию, включающую растительные компоненты (экстракт плодов шиповника, травы зверобоя, листьев леспедецы и корней солодки), зостерин, биологически активные вещества морских гидробионтов (мидия, лосось, кальмар), поливитамины, сахарозаменители и/или сахар. Композиция "Гербамарин" представляет собой таблетированную форму, основным компонентом которой является зостерин. Она предназначена для добавки к пище в качестве восстановительного средства при самых различных заболеваниях, в том числе при ожирении.

На основании проведенных исследований были сделаны следующие выводы:

1. Включение таблетированной формы "Гербамарина" по 2-3 таблетки в день за 30 мин до еды в течение 3 нед у больных с неосложненными формами ожирения и при его сочетании с поражением сердечно-сосудистой системы, локомоторного аппарата, органов системы пищеварения, при нарушениях липидного и углеводного обмена проводилось на фоне индивидуально подобранных редуцированных рационов и существенно не влияло на их энергетическую ценность.

2. Переносимость "Гербамарина" была хорошей, отмечался приятный вкус и аромат данной биологически активной добавки к пище.

3. У 46% больных на фоне приема "Гербамарина" констатировалось снижение аппетита, позволяющее больным более комфортно переносить редуцированные рационы.

4. У больных, получавших "Гербамарин", регистрировалась более выраженная по сравнению с контролем депрессия показателей жирового и углеводного обмена (снижение концентрации сахара в крови, уровня холестерина и триглицеридов).

5. Органолептические свойства, направленность воздействия позволяют рекомендовать "Гербамарин" для включения в рацион как здорового, так и больного человека.

6. Желательно использование "Гербамарина" при заболеваниях метаболического профиля (ожирение, сахарный диабет, гиперлипидемия), в качестве дополнительного

терапевтического средства у больных после тяжелых инфекций, а также лицами пожилого возраста.

7. Учитывая химический состав и мягкость коррегирующего воздействия на состояние здоровья больных можно рекомендовать "Гербамарин" как биологически активную добавку к пище, усиливающую при длительном применении терапевтическое воздействие традиционных диетических и других видов лечения.

В состав зостеринсодержащего напитка "Флора-Вита" входят натуральные соки (яблочный, цитрусовый, лимонника китайского *Schizandra chinensis* Bail.), биологически активные вещества - адаптогены из корней дальневосточной элитной популяции женьшеня *Panax ginseng* C.A. Meyer, элеутерококка колючего *Eleuterococcus senticosus* Max., натуральный мед и зостерин. "Флора-Вита" является напитком с высокой биологической ценностью при низкой энергетической емкости (35,9 ккал/100 мл) и действия, направленного на обменные процессы в организме.

Проведенная клиническая апробация зостеринсодержащего напитка "Флора-Вита" у больных с осложненными и неосложненными формами ожирения при использовании биохимических тестов показала следующее:

1. Включение в суточный рацион 250 мл напитка сопровождалось у подавляющего большинства (96%) больных приятным чувством удовлетворения вкусовыми качествами напитка и отсутствием каких-либо диспептических расстройств или неприятных ощущений.

2. У 30% больных прием напитков сопровождался уменьшением чувства голода.

3. В контролируемых условиях стационара у больных ожирением констатировано выраженное лечебное воздействие диеты, содержащей напитки, на клинико-биохимические показатели, в том числе на уровень артериального давления и на интенсивность снижения массы тела.

4. Выявлено положительное воздействие напитка на моторно-эвакуаторную функцию кишечника, способствующее уменьшению явлений запора.

5. Наиболее отчетливый терапевтический эффект зарегистрирован при использовании напитка у больных с гиперхолестеринемией, где имело место достоверное снижение в сыворотке крови содержания холестерина, значительно более выраженное, чем в контрольной группе, получавшей ту же диету, но без включения напитка с зостерином.

Нами разработан также зостеринсодержащий сиропный бальзам "Гербамарин", представляющий собой комбинацию биологически активных веществ из растительных (35 видов лекарственных растений) и животных (мидия, лосось, кальмар) организмов. Как показали совместные исследования Института медицинской климатологии и восстановительного лечения СО РАМН с ТИБОХ ДВО РАН сиропный бальзам "Гербамарин" является достаточно эффективной лечебно-профилактической добавкой, которая может применяться при снижении антиоксидантной активности крови, активации коэффициента соотношения МДА (уровня малонового диальдегида)/АОА (интегрального показателя антиоксидантной активности) и при умеренном снижении показателей гуморального иммунитета (таблица 21).

В другом наблюдении регистрировались показатели липидного спектра и мочевой кислоты у 20 человек до и после приема сиропного бальзама "Гербамарин" (таблица 22).

Как следует из данных, приведенных в таблице 22 из показателей липидного профиля достоверные изменения в лучшую сторону обнаружили ТГ (триглицериды), уровень которых снизился на 37% и ХС ЛПВП (холестерин липопротеидов высокой

Таблица 21.

Динамика показателей иммунорезистентности на фоне приема "Гербамарина" (в обследование включено 32 человека)

Показатели	До приема	После приема
МДА, мкм/мл	9.50 ± 0.39	9.35 ± 0.49
АОА, %	42.9 ± 3.02	55.10 ± 3.28***
IgA, г/л	1.50 ± 0.13	1.76 ± 0.12**
IgM, г/л	1.03 ± 0.10	1.13 ± 0.07
IgG, г/л	7.36 ± 0.53	8.47 ± 0.32**
IgE, ЕД	30.8 ± 1.12	27.3 ± 2.45*

Примечание: \* - p<0,02; \*\* - p<0,05; \*\*\* - p<0,01 - различия достоверны по сравнению с показателями до приема

плотности), увеличившийся на 31%. Более чем в 2 раза снизился и индекс атерогенности. Средний показатель ОХС (общий холестерин) при этом почти не изменился, оставаясь в пределах умеренной гиперхолестеринемии, если принимать за верхнюю границу нормы,

Таблица 22.

Динамика биохимических показателей на фоне приема "Гербамарина"

Показатели	До приема	После приема
ОХС (ммоль/л)	5,34 ± 0,62	5,2 ± 0,59
ХС-ЛПВП (ммоль/л)	1,41 ± 0,12	1,85 ± 0,103*
ТГ (ммоль/л)	1,41 ± 0,10	0,89 ± 0,09***
ИА (ед)	4,79 ± 0,62	2,16 ± 0,14***
Мочевая кислота (ммоль/л)	0,287 ± 0,01	0,233 ± 0,01***

Примечание: \* - p<0,02; \*\* - p<0,01; \*\*\* - p<0,001 - различия достоверны по сравнению с показателями до приема.

как рекомендуют эксперты ВОЗ - 5,1 ммоль/л. Благоприятное действие прием "Гербамарина" оказывает и на уровень мочевой кислоты в крови, который заметно снизился по сравнению с исходным.

Таким образом, проведенная клиническая апробация зостеринсодержащих пищевых добавок подтверждает правильность выбранного направления по использованию зостерина, как биологически активного вещества, в различных комбинациях с другими биологически активными веществами растительного и животного происхождения.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Освоение биохимических ресурсов Мирового океана переживает сейчас период подъема, что является новой качественной основой для биотехнологических работ, а также путей и способов создания лекарственных средств. Судя по результатам проведенных исследований, морские биополимеры выступают как многофункциональные биологически активные вещества, где наряду с основным направлением действия (например, противоопухолевым; иммуномодулирующим; детоксикационным; антивирусным; антибактериальным и т.д.) отмечаются и другие, сопряженные с основным, положительные эффекты. В свою очередь, в зависимости от задач и целей использования конкретного биополимера решается его судьба как биологически активного агента. В некоторых исследованиях прослеживается прямая связь между биологической активностью биополимера и его функциональной ролью как биохимического соединения непосредственно в организме-продуценте. Малая токсичность морских биополимеров может служить объективной предпосылкой их успешного исследования в предклинике и клинической практике.

Несмотря на широкий круг веществ, используемых при создании современных биологически активных добавок, все они, как правило, получены из растительных и животных организмов наземного происхождения. Практически неустраиваемые для этих целей биологически активные вещества морских организмов, в частности морские биополимеры, отличаются от веществ наземных организмов как химическим строением, так и особенностями биологического действия. Уникальные химические структуры и необычно высокая биологическая активность морских биополимеров привлекают сегодня к этим веществам все большее внимание.

Научно обоснованное применение морских биополимеров в сочетании с известными веществами наземного происхождения открывает перспективы создания биологически активных добавок нового поколения - с более широким и эффективным спектром биологического действия.

Не приходится сомневаться в том, что всестороннее изучение морских биополимеров принесет немало интересных открытий. Успех на этом пути может быть достигнут только при фундаментальном изучении биохимии морских организмов и разностороннем исследовании биологической активности их структурных компонентов.

### ВЫВОДЫ

1. Изучен спектр биологической активности ряда морских биополимеров животного и растительного происхождения. Общим свойством исследуемых биополимеров является способность ингибировать рост злокачественных новообразований, модулировать реакции иммунитета, а также препятствовать росту вирусов и бактерий. Механизм биологического действия биополимеров реализуется на молекулярно-клеточном и системном уровнях.
2. Способность митилана повышать биологическую реактивность организма-опухоленосителя, а также положительно влиять на его иммунологическую реактивность (стимуляция иммуногенеза, митогенная активность *in vitro* и *in vivo*, усиление фагоцитарной и цитостатической активности макрофагов), сочетается с другой необычной способностью этого биополимера: оказывать прямое цитотоксическое действие на опухолевые клетки. Настоящий феномен обусловлен разнонаправленным характером действия структурных компонентов митилана, что по сути и определяет его как противоопухолевый препарат сложного механизма действия. Показана

принципиальная возможность усиления митиланом противоопухолевой активности известных противоопухолевых цитостатиков.

3. Определена углеводная и молекулярно-эпитопная специфичность лектинов мидии *C. Grayanus*. На основании изучения иммунобиологических и адгезивных свойств лектинов сделан вывод о перспективности их использования в качестве биохимических препаратов: для диагностики злокачественных новообразований (Л-1) и культивирования поверхностно-зависимых клеток (Л-2).
4. Установлено, что биопродуцентами лектинов Л-1 и Л-2 в организме мидии *C. grayanus* являются целоциты. На основании данных по избирательному взаимодействию Л-1 и Л-2 с различными микроорганизмами, в том числе ассоциированными с мидией, сделан вывод о существенной роли исследуемых лектинов в регуляции таксономического и количественного состава микробного комплекса организма-хозяина.
5. Механизм противоопухолевого действия кораллана лежит в комплексе реактивных изменений организма-опухоленосителя, включающих в себя иммуномодуляцию, усиление степени макрофагальной инфильтрации опухолевого очага и активизацию ретикуло-эндотелиальной системы. Направленная модификация физико-химических характеристик кораллана приводит к снижению вязкости его растворов, токсичности и аллергогенности.
6. Методология получения новых производных хитоолигосахаридов является перспективным направлением создания высокоэффективных водорастворимых и малотоксичных противоопухолевых соединений.
7. Исследование кинетики антибактериальной активности сульфатированного полисахарида фукоидана, а также действие его на гуморальный и клеточный иммунитет позволяет отнести фукоидан к поколению препаратов с ассоциированной антибактериальной и иммуномодулирующей активностью. Сульфатированный олигосахарид уронофукан, полученный из того же природного источника (бурая водоросль *Laminaria japonica*) препятствует развитию ВИЧ-инфекции *in vitro* путем прямой нейтрализации вируса и ингибции его адсорбции на клетках мишенях, а также подавлением активности обратной транскриптазы. При этом уронофукан обладает анти-ВИЧ активностью в концентрациях более, чем в 100 раз низких, чем его антикоагуляционная активность (высокая антикоагуляционная активность - главное ограничение на пути использования сульфатированных полисахаридов).
8. Полисахарид зостерин обнаруживает свойства высокоактивного энтеросорбента: связывает и выводит из организма ионы тяжелых металлов, радионуклиды, патогенные микроорганизмы (включая их прямое ингибирование). Сорбционные свойства зостерина вносят существенный вклад в проявление таких видов активности, как антидотная, гипохолестеринемическая, антибактериальная, противоязвенная и геропротекторная. Полученные данные по распределению меченого <sup>3</sup>H-зостерина в организме животных позволяют сделать вывод о двунаправленном антидотном действии зостерина: энтеросорбционном и гуморально-сорбционном (в частности, гемосорбционном).

9. Солевые формы зостерина (аммонийная, натриевая и калиевая) превышают антидотное действие зостерина (наиболее активная форма - аммонийная), однако для того, чтобы составить альтернативу зостерину необходимо их тщательное исследование на биодоступность, токсичность и другие критерии физиологичности.
10. Применение антидотной терапии среди рабочих свинцово-цинковых производств показало, что зостерин нормализует наиболее показательные биохимические признаки свинцовой интоксикации, снижает концентрацию свинца в крови, повышая его экскрецию с мочой и калом. Результаты наблюдений показывают, что для полной эвакуации свинца, поступающего в организм, в условиях промышленного производства, объективно необходим длительный (а по возможности - постоянный) прием зостерина.
11. Комбинированные формы зостерина, аккумулируя в небольшом объеме высокую биологическую активность, существенно влияют на обменные процессы организма. Проведенная клиническая апробация пищевой добавки "Гербамарин" и лечебно-профилактического напитка "Флора-Вита" подтверждает правильность выбранного направления по использованию зостерина в различных комбинациях с биохимическими соединениями растительного и животного происхождения.

#### ОСНОВНЫЕ ПУБЛИКАЦИИ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Лоенко Ю.Н., Оводова Р.Г., Шибаева В.И., Козячкина А.А., Гефт В.Н., Прокофьева Н.Г. Противоопухолевая активность полисахаридных комплексов из мидии Японского и Черного морей. // Химиотерапия опухолей в СССР. 1980. Вып.32. С.72-79.
2. Запорожец Т.С., Лоенко Ю.Н., Оводова Р.Г., Тимченко Н.Ф., Прокофьева Н.Г., Беседнова Н.Н. Стимуляция неспецифической резистентности организма митиланом - полисахаридом, выделенным из мидии *Crenomytilus grayanus*. // Антибиотики. 1981. №6. С.460-465.
3. Авторское свидетельство СССР № 906071 (приоритет от 16.11.79). Способ получения углевод-белкового соединения, обладающего противоопухолевой и иммуностимулирующей активностью. / Оводова Р.Г., Оводов Ю.С., Шибаева В.И., Лоенко Ю.Н., Софьина З.П., Романенко Е.А., Мазаева В.Г., Седакова Л.А., Фирсова Г.А., Беседнова Н.Н., Запорожец Т.С., Идалия П.Г. (Куба).
4. Лоенко Ю.Н., Оводова Р.Г., Прокофьева Н.Г., Молчанова В.И., Оводов Ю.С. Влияние митилана - D-глюкана из *Crenomytilus grayanus* на иммунобиологическую реактивность интактного и опухолевого организма. // Химиотерапия опухолей в СССР. 1982. Вып.35. С.219-227.
5. Лоенко Ю.Н., Оводова Р.Г., Молчанова В.И., Прокофьева Н.Г., Оводов Ю.С., Седенкова Л.А., Межаева В.Г., Фирсова Г.А. К механизму действия противоопухолевого углеводсодержащего биополимера из мягкого коралла *Pseudopterogorgia americana*. // Химиотерапия опухолей в СССР. 1982. Вып.37. С.22-25.
6. Лоенко Ю.Н., Оводова Р.Г., Молчанова В.И., Оводов Ю.С., Прокофьева Н.Г. Новый противоопухолевый углеводсодержащий биополимер из тридакны. // Химиотерапия опухолей в СССР. 1982. Вып.37. С.26-29.

7. Оводов Ю.С., Оводова Р.Г., Лоенко Ю.Н. Биогликаны - иммуномодуляторы. // Тезисы докладов VII Всесоюзной конференции "Химия и биохимия". Пушкино, 1982. С.4-5.
8. Лоенко Ю.Н., Оводова Р.Г., Молчанова В.И., Прокофьева Н.Г. Влияние сочетанного применения иммуностимулятора митилана и циклофосфана на карциному Эрлиха. // Химиотерапия опухолей в СССР. 1983. Вып.39. С.18-22.
9. Ovodov R.G., Loenko Yu.S., Molchanova V.I., Prokofiyeva N.G., Ovodov Yu.S. Bioglycans of marine invertebrates as immunopotentiators. // Abstracts of Papers of the 2-nd European Symposium on Carbohydrates and Glycoconjugates. Budapest, 1983. P.29.
10. Оводов Ю.С., Оводова Р.Г., Лоенко Ю.Н. Биогликаны - иммуномодуляторы. // Химия природ. соединений. 1983. № 6. С.128-148.
11. Лоенко Ю.Н., Оводова Р.Г., Молчанова В.И., Прокофьева Н.Г. К механизму противоопухолевого действия митилана и кораллана. // Химиотерапия опухолей в СССР. 1984. Вып.41. С.118-124.
12. Оводова Р.Г., Глазкова В.Е., Лоенко Ю.Н., Молчанова В.И., Прокофьева Н.Г. Сравнительное изучение способов получения противоопухолевого иммуностимулятора митилана. // Химиотерапия опухолей в СССР. 1984. Вып.41. С.111-117.
13. Лоенко Ю.Н., Оводова Р.Г., Гришин Ю.И., Коробов А.П., Худоложкина А.М., Ковалевская А.М. Лектиновые свойства митилана - противоопухолевого биогликана из мидии Японского моря // Химиотерапия опухолей в СССР. 1985. Вып.43. С.86-91.
14. Оводова Р.Г., Лоенко Ю.Н., Прокофьева Н.Г., Командрова Н.А. Иммуностимулирующая активность биогликанов морских моллюсков Индопацифики. // Журн.микробиологии, эпидемиологии и иммунол., 1985. №3. С.121-122.
15. Авторское свидетельство СССР № 1464322 (приоритет от 03.10.85). Способ получения протеина, обладающего противоопухолевой активностью. / Оводова Р.Г., Глазкова В.Е., Артюков А.А., Курика А.В., Беседнова Н.Н., Лоенко Ю.Н., Оводов Ю.С.
16. Крылова Н.В., Глазкова В.Е., Кирилличева Г.Б., Запорожец Т.С., Лоенко Ю.Н., Беседнова А.Л., Туманян М.А. К механизму защитного действия биогликанов морских беспозвоночных при экспериментальной псевдотуберкулезе // Сб.Вопросы микробиологии, патогенеза и лабораторной диагностики иерсиниозов. Новосибирск. 1985. С.41-46.
17. Гефт В.Н., Оводова Р.Г., Монин В.Л., Лоенко Ю.Н. Способ получения биогликана из мидии *Mytilus galloprovincialis* Lam. // Химиотерапия опухолей в СССР. 1986. Вып.44. С.224-227.
18. Лоенко Ю.Н., Глазкова В.Е., Артюков А.А., Руцкова Т.А., Оводова Р.Г. Противоопухолевая активность нового галактозоспецифического лектина из промыслового моллюска *Crenomytilus grayanus*. // Химиотерапия опухолей в СССР. 1987. Вып.50. С.120-123.
19. Лямкин Г.П., Артюков А.А., Ковалев В.В., Лоенко Ю.Н. Влияние зостерина, альгината натрия и различных видов пектинов на связывание и выведение свинца из организма. // Всесоюзный семинар "Проблемы производства продукции из красных и бурых водорослей". Владивосток, 1987. С.67-68.
20. Лоенко Ю.Н., Оводова Р.Г., Ковалев В.В., Артюков А.А. Противоопухолевая активность зостерина - пектина из морской травы *Zosteraceae*. // Химиотерапия опухолей в СССР. 1987. Вып.50. С.141-144.
21. Беседнова Н.Н., Оводова Р.Г., Крылова Н.В., Глазкова В.Е., Лоенко Ю.Н. К механизму иммуномодулирующего действия биогликана из мидии *Crenomytilus grayanus*, обладающего противоопухолевой активностью. // Химиотерапия опухолей в СССР. 1987. Вып.50. С.128-131.

22. Глазкова В.Е., Лоенко Ю.Н., Купера Е.В., Артюков А.А. Оптимизация стадии экстракции в технологическом процессе получения митилана, обладающего иммуностимулирующей и противоопухолевой активностью. // Химиотерапия опухолей в СССР. 1988. Вып.51. С.120-125.
23. Loyenko Yu.N., Artyukov A.A., Glazkova V.E., Rutsikova T.A. Galactozospecific lectin from the mussel *Crenomytilus grayanus*. // Abstracts of Papers of the X-th International Lectin Conference. Czechoslovakia, Prague, 1988. P.3.
24. Авторское свидетельство СССР №1652319 (приоритет от 25.07.1988). Производные хитоолигосахаридов, обладающие иммуномодулирующей и противоопухолевой активностью / Горбач В.И., Красикова И.Н., Лукьянов П.А., Лоенко Ю.Н., Соловьева Т.Ф., Оводов Ю.С., Мороз Л.В., Пименов А.А., Грубова Е.А., Деев В.В., Кириллова И.В., Рахмилевич А.Л., Митдал Т.Л., Фукс Б.Б., Рахимова М.С.
25. Lyamkin G.P., Artyukov A.A., Loyenko Yu.N. The application of marine natural polysaccharides to remove lead ions from organism // Proceedings of the VI International Symposium on marine natural products. Senegal, Dakar, 1989. P.12.
26. Loyenko Yu.N., Glazkova V.E., Mikhailov V.V., Artyukov A.A., Rutsikova T.A. The selectivity of the interaction of lectins isolated from *Crenomytilus grayanus* with some spp. // Abstracts of Papers of the 11-th International Lectin Conference. Estonia, Tartu University, 1989. P.45.
27. Авторское свидетельство СССР №1624973 (приоритет от 26.01.1989). Способ получения биогликана из мидий. / Оводова Р.Г., Глазкова В.Е., Оводов Ю.С., Молчанова В.И., Гефт В.Н., Михайская Л.В., Артюков А.А., Лоенко Ю.Н.
28. Лоенко Ю.Н., Артюков А.А., Лямкин Г.П., Глазкова В.Е., Руцкова Т.А. Лектины и агглютинины морских водорослей. // Растит.ресурсы. 1990. Т.26. Вып.2. С.263-274.
29. Попов А.М., Лямкин Г.П., Артюков А.А., Лоенко Ю.Н., Еляков Г.Б. Изучение фармакокинетики зостерина - пектина из морской травы *Zostera asiatica* // Докл. АН СССР. 1990. Т.315, №1. С.232-235.
30. Evtushenko E.V., Loyenko Yu.N., Ovodova R.G., Ovodov Yu.S. Epitopic specificity of galactose-specific from mussel *Crenomytilus grayanus* // Abstracts of Paper of the 12-th International Lectin Conference, USA, Davis, 1990. P.65.
31. Патент Российской Федерации №1782601 (приоритет от 2.10.1990). Способ лечения гастроэнтерологических заболеваний. / Мирошниченко В.А., Папернова Н.Ю., Оводов Ю.С., Оводова Р.Г., Лямкин Г.П., Артюков А.А., Лоенко Ю.Н.
32. Лоенко Ю.Н., Лямкин Г.П., Артюков А.А., Ковалев В.В., Иванов Л.Г. Модифицирующее действие зостерина на метастатический процесс в эксперименте. // Химиотерапия опухолей в СССР. 1991. Вып.56. С.53-55.
33. Loyenko Yu.N., Popov A.M., Aminin D.L., Artyukov A.A., Glazkova V.E. Macrophagal cytotoxicity for tumor cells induced by lectin from mussel *Crenomytilus grayanus*. // Abstracts of Paper of the 13-th International Lectin conference. Germany, Berlin, 1991. P.32.
34. Лоенко Ю.Н., Лямкин Г.П., Ковалев В.В., Артюков А.А., Иванов Л.Г. Снижение зостерином токсического действия 5-фторурацила в эксперименте на мышах // Химиотерапия опухолей в СССР. 1991. Вып.56. С.50-52.
35. Лоенко Ю.Н., Молчанова В.И., Иванов Л.Г., Оводова Р.Г. Противоопухолевые и иммуномодулирующие свойства модифицированной формы кораллана. // Химиотерапия опухолей в СССР. 1991. Вып.56. С.56-60.
36. Запорожец Т.С., Беседнова Н.Н., Лоенко Ю.Н., Лямкин Г.П., Попов А.М. Иммуномодулирующие свойства пектина из морской травы сем. *Zosteraceae*. // Антибиотики и химиотерапия. 1991. Т.36. №8. С.31-34.

37. Лоенко Ю.Н., Лямкин Г.П., Артюков А.А., Еляков Г.Б. Биологически активные полисахариды морских водорослей и морских цветковых растений. // Растит. ресурсы. 1991. Т.27. Вып.3. С.150-160.
38. Запорожец Т.С., Беседнова Н.Н., Лямкин Г.П., Лоенко Ю.Н., Попов А.М. Антибактериальная и терапевтическая эффективность пектина из морской травы *Zostera*. // Антибиотики и химиотерапия. 1991. Т.36. №4. С.24-26.
39. Патент Российской Федерации №2019186 (приоритет от 28.02.91). Способ ингибции ВИЧ-инфекции / Быковский А.Ф., Миллер Г.Г., Покидышева Л.Н., Титова И.В., Артюков А.А., Попов А.М., Прозоровский С.В., Лоенко Ю.Н., Хесс Джозеф (США), Еляков Г.Б., Стоник В.А., Исаков В.В.
40. Лоенко Ю.Н., Аминин Д.Л., Глазкова В.Е., Артюков А.А., Попов А.М. Биохимические особенности цитотоксического действия лектина из мидии Японского моря *Crenomytilus grayanus*. // Всесоюзное совещание "Биологически активные вещества гидробионтов - новые лекарственные лечебно-профилактические и технические препараты". Владивосток, 1991. С.83-84.
41. Патент СССР №1833167 (приоритет от 13.12.91). Безалкогольный напиток "FLORA-VITA". / Платова Е.А., Кудряшова А.А., Артюков А.А., Лоенко Ю.Н., Иванова Л.Г., Федосов Ю.В., Бокарев А.В., Козловский В.А.
42. Патент СССР №1833165 (приоритет от 22.12.91). Безалкогольный напиток "VITA-MARINA". / Платова Е.А., Кудряшова А.А., Артюков А.А., Лоенко Ю.Н., Иванов Л.Г., Федосов Ю.В., Бокарев А.В., Козловский В.А.
43. Патент СССР №1833166 (приоритет от 13.12.91). Безалкогольный тонизирующий напиток "ALGUE-VITA". / Платова Е.А., Кудряшова А.А., Артюков А.А., Лоенко Ю.Н., Иванов Л.Г., Федосов Ю.В., Бокарев А.В., Козловский В.А.
44. Лоенко Ю.Н., Глазкова В.Е., Артюков А.А., Оводова Р.Г. Лектины морских беспозвоночных. // Успехи соврем.биологии. 1992. Т.112. Вып.5-6. С.785-794.
45. Патент Российской Федерации №2000064 (приоритет от 15.04.92). Способ получения пектина из морских трав / Артюков А.А., Лоенко Ю.Н., Ковалев В.В., Платова Е.А., Федосов Ю.В., Еляков Г.Б.
46. Шапошникова Т.М., Бородина Н.П., Снегирева А.Е., Шевлягин В.Я., Попов А.М., Артюков А.А., Лоенко Ю.Н., Еляков Г.Б. Ингибирующее влияние полисахаридов морского генеза на развитие вирусиндуцированного лейкоза Раушера // Докл. РАН. 1992. Т.324, №4. С.881-884.
47. Krashevsky S.V., Loyenko Yu.N., Artyukov A.A., Kozlovskaya E.P., Fedosov Yu.V. Experimental study of radioprotective and antitumor properties of immunomodulating biopreparations. // Abstracts of Papers of the 8-th International Conference on chemical modifiers of Cancer Treatment. Japan, Kyoto, 1993. P.203.
48. Gorbach V.I., Krasikova I.N., Lykhanov P.A., Loyenko Yu.N., Solovieva T.F., Ovodov Yu.S., Deev V.V., Pimenov A.A. New glycolipids (chitoooligosaccharide derivatives) possessing immunostimulating and antitumor activities. // Carbohyd. Res. 1994. V.260. P.73-82.
49. Besednova N.N., Zaporozhets T.S., Elyakova L.A., Ovodova R.G., Loyenko Yu.N. Effect of some naturally originated immunocorrector to immune system. // Abstracts of Papers of 2-nd Far-Eastern International Symposium Multimodality Treatment of Cancer. Vladivostok, 1994. P.54.
50. Запорожец Т.С., Лоенко Ю.Н., Беседнова Н.Н. Антибактериальная и иммуномодулирующая активность фукоидана // Антибиотики и химиотерапия. 1995.
51. Лоенко Ю.Н., Артюков А.А., Козловская Э.П., Гафуров Ю.М., Попов А.М., Козловский А.С., Ковалев В.В., Еляков Г.Б. "ГЕРБАМАРИН" ("*Herba*" - трава, растение; "*Marinus*" - морской) - новое парафармацевтическое средство массовой экодетоксикации населения

- Дальнего Востока. // Региональная ассамблея "Здоровье населения Дальнего Востока". Владивосток, 1996. С.259.
52. Патент Российской Федерации № 2092077 (приоритет от 14.11.96г.). Композиция ингредиентов для сиропа-бальзама "ГЕРБАМАРИН" / Гафуров Ю.М., Лоенко Ю.Н., Рассказов В.А., Козловская Э.П., Артюков А.А., Козловский А.С., Емец Ю.А., Мазурик В.Г., Колей О.Н., Савостьянова Г.Е., Бокарев А.В., Еляков Г.Б.
53. Патент Российской Федерации № 2093046 (приоритет от 06.05.96). Лечебно-профилактическая пищевая композиция "ГЕРБАМАРИН". / Лоенко Ю.Н., Козловская Э.П., Артюков А.А., Ковалев В.В., Козловский А.С., Горовой П.Г., Гафуров Ю.М., Рассказов В.А., Попов А.М., Еляков Г.Б.
54. Лоенко Ю.Н., Артюков А.А., Козловская Э.П., Мирошниченко В.А., Еляков Г.Б. Зостерин. // Владивосток: Дальнаука, 1997. 212 с.
55. Павлушенко Е.В., Геронина С.А., Козявина Н.В., Лоенко Ю.Н. Влияние нутриента "ГЕРБАМАРИН" на некоторые показатели иммунорезистентности // Новые биомедицинские технологии с использованием биологически активных добавок / Под ред. Е.М.Иванова. Владивосток. 1998. С.41-45.
56. Авдеева Е.В., Павлушенко Е.В., Лоенко Ю.Н. Нутриент "ГЕРБАМАРИН" - возможности профилактического применения // Новые биомедицинские технологии с использованием биологически активных добавок / Под ред. Е.М.Иванова. Владивосток. 1998. С.174-177.

**Юрий Николаевич ЛОЕНКО**

**БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ  
И МЕХАНИЗМ ДЕЙСТВИЯ БИОПОЛИМЕРОВ  
ИЗ МОРСКИХ ОРГАНИЗМОВ**

**А В Т О Р Е Ф Е Р А Т**

---

Изд. лиц. ЛР № 040118 от 15.10.96 г. Подписано к печати 19.05.96 г.  
Формат 60x84/16. Печать офсетная. Усл.п.л. 3,88. Уч.-изд.л. 3,41.  
Тираж 100 экз. Заказ 96

---

Отпечатано в типографии издательства «Дальнаука» ДВО РАН  
690041, г. Владивосток, ул. Радио, 7