МОСКОВСКАЯ ГОСУДАРСТВЕННАЯ АКАДЕМИЯ
ВЕТЕРИНАРНОЙ МЕДИЦИНЫ И БИОТЕХНОЛОГИИ
ИМ. К.И.СКРЯБИНА

На правах рукописи

САПОЖНИКОВА АЛЛА ИОНОВНА

УДК 637 (043.3)

РАЗРАБОТКА И ОЦЕНКА КАЧЕСТВА ПРОДУКЦИИ НА ОСНОВЕ ФИБРИЛЛЯРНЫХ БЕЛКОВ ИЗ ОТХОДОВ СЫРЬЯ ЖИВОТНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ

Специальность 05.19.08
Товароведение промышленных товаров и сырья легкой промышленности

ДИССЕРТАЦИЯ

НА СОИСКАНИЕ УЧЕНОЙ СТЕПЕНИ

ДОКТОРА ТЕХНИЧЕСКИХ НАУК

Президиум ВАК России
(решение от "14 апреля 2000 г., № 15/5)
присудил ученую степень ДОКТОРА
технических наук
Начальник управления ВАК России

НАУЧНЫЙ КОНСУЛЬТАНТ:
ДОКТОР ТЕХНИЧЕСКИХ НАУК,
ПРОФЕССОР
С.А.КАСПАРЬЯНЦ

МОСКВА 1999

ОГЛАВЛЕНИЕ

стр.

ВВЕДЕНИЕ ……....5
ГЛАВА 1.СОВРЕМЕННЫЕ ПРЕДСТАВЛЕНИЯ О СТРОЕНИИ И СВОЙСТВАХ ФИБРИЛЛЯРНЫХ БЕЛКОВ.....14
1.1. Коллаген.....16
1.2. Эластин.....28
1.3 Кератин.....40
ГЛАВА 2. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ……....54
ГЛАВА 3. ХАРАКТЕРИСТИКА БЕЛОКСОДЕРЖАЩИХ ОТХОДОВ КАК СЫРЬЯ ДЛЯ НАРАБОТКИ ФИБРИЛЛЯРНЫХ БЕЛКОВ.....78
3.1. Изучение биологических процессов, происходящих в дерме снятых шкур при хранении.....78
3.2. Химический состав некоторых видов белоксодержащих отходов животного сырья..... 89
3.3. Анализ структурных особенностей коллаген-, эластин- и кератинсодержащих отходов..... 96
ГЛАВА 4. РАЗРАБОТКА СПОСОБОВ ПОЛУЧЕНИЯ ВЫСОКООЧИЩЕНЫХ ПРЕПАРАТОВ ФИБРИЛЛЯРНЫХ БЕЛКОВ ИЗ БЕЛОКСОДЕРЖАЩИХ ОТХОДОВ СЫРЬЯ ЖИВОТНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ.....108
4.1.Коллаген.....108
4.1.1. Получение фибриллярного коллагена.....109
4.1.2. Разработка способов получения растворов молекулярно-диспергированного коллагена.....124
4.2. Эластин.....143
4.2.1. Разработка способа получения раствора молекулярно-диспергированного эластина.....143
4.3. Кератин.....146
4.3.1. Разработка способа получения раствора молекулярно-

диспергированного кератина.....146
ГЛАВА 5. ВЫБОР ПОКАЗАТЕЛЕЙ, ХАРАКТЕРИЗУЮЩИХ КАЧЕСТВО ПРЕПАРАТОВ ФИБРИЛЛЯРНЫХ БЕЛКОВ.....159
5.1. Оценка химической чистоты препаратов.....159
5.2. Токсико-гигиенические показатели качества препаратов фибриллярных белков.....161
5.3. Оценка агрегативной стабильности препаратов коллагена, эластина и кератина.....164
5.4. Антигенные и иммуногенные свойства коллагена и препаратов на его основе.....169
5.5. Оценка показателей, характеризующих качество препарата на основе фибриллярного коллагена 175
5.6. Применение тест-системы для диагностики коллагенозов у людей и животных.....182
ГЛАВА 6. АССОРТИМЕНТ И ПОТРЕБИТЕЛЬСКИЕ СВОЙСТВА ПРЕПАРАТОВ И БИОМАТЕРИАЛОВ, ПОЛУЧЕННЫХ НА ОСНОВЕ ФИБРИЛЛЯРНЫХ БЕЛКОВ.....185
6.1. Инъекционные формы препаратов на основе коллагена и характеристика их свойств.....187
6.1.1. Антистрессовый состав – Аминакол.....187
6.1.2. Комплексный витаминный препарат – Витакол.....195
6.1.3. Цитостатики различной химической природы, иммобилизованные на коллагене.....197
6.2. Мази на основе коллагена и характеристика их свойств.....199
6.3. Пленки на основе коллагена и характеристика их свойств..200
6.3.1. Пленки с антибиотиками.....203
6.3.2. Пленки с гиалуроновой кислотой.....205
6.3.3. Пленки с нейропептидами.....207
6.3.4. Пленки с антиникотиновой добавкой.....208
6.4. Коллаген как микроноситель для культивирования клеток..211

6.5. Коллаген как сорбент для аффинной хроматографии.....221
6.6. Применение коллагена для шлихтования пряжи.....223
6.7. Использование солюбилизированных фибриллярных белков в качестве добавок в косметические средствах.....227
ВЫВОДЫ 234
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....237
ПРИЛОЖЕНИЯ 280

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность проблемы. Специфика переработки сырья животного происхождения для нужд легкой промышленности такова, что в процессе получения основной товарной продукции около половины исходного сырья на различных стадиях технологического процесса превращается в отходы. При этом предприятие лишается возможности получать дополнительные доходы и прибыль, которые могли бы генерироваться в случае эффективной утилизации отходов.

В этой связи проблема комплексной переработки сырья с использованием ресурсо- и энергосберегающих технологических решений, включающих вовлечение в хозяйственный оборот отходов производства в качестве вторичного сырья для смежных отраслей, приобретает особую значимость и актуальность.

Особенно это касается белоксодержащих отходов кожевенного, мясоперерабатывающего и шерстеперерабатывающего производств, основу которых составляют уникальные по своим свойствам фибриллярные белки - коллаген, эластин и кератин.

В настоящее время лишь некоторые виды белоксодержащих отходов перерабатывают в кормовые добавки, биоминеральные удобрения, клеи, строительные материалы, используя метод гидролиза при повышенных температурных режимах и давлении. Однако такой технологический прием ведет к потере специфических свойств, присущих нативным фибриллярным белкам, что сужает возможные области их практического применения.

В последние годы благодаря многочисленным исследованиям, направленным на изучение такой многокомпонентной и многофункциональной системы как сырье животного происхождения, появилась возможность извлекать из него коллаген, эластин и кератин, не нарушая молекулярную структуру и сохраняя биологическую активность этих биополимеров, и использовать их в качестве основы или специальных добавок при производстве препаратов и материалов для ветеринарии, медицины, биотехнологии, косметологии и др.

Продукция такого рода, несмотря на высокую стоимость, пользуется большим спросом, хотя ассортимент ее невелик.

Следует отметить, что вопросы, касающиеся получения и очистки фибриллярных белков, до конца не изучены. В частности, нет четко сформулированной концепции экологически безопасной и экономически выгодной переработки белоксодержащих отходов в биологически активные препараты нового поколения; отсутствуют регламентированные инструкции по их изготовлению и контролю; нет четко сформулированных требований по стандартизации готовых препаратов.

Приходится констатировать, что системный подход к разработке и осуществлению в производственных условиях научно-обоснованных технологий по целенаправленной наработке фибриллярных белков из нереализуемого по прямому назначению некондиционного животного сырья и белоксодержащих отходов с учетом их вида, состава и свойств в настоящее время отсутствует. Это, в свою очередь, тормозит возможности налаживания промышленного выпуска принципиально новых препаратов и материалов, содержащих фибриллярные белки.

В связи с вышеизложенным, возникает настоятельная необходимость во всесторонних комплексных исследованиях животных тканей, содержащих фибриллярные белки, в выявлении основных закономерностей их строения, химического состава, свойств, разработке научно-обоснованных методов выделения коллагена, эластина и кератина, обеспечивающих высокое качество и уровень наработки этих перспективных биополимеров, создании на их основе препаратов и материалов нового поколения.

Исследования в этой области представляют новое научное направление, имеющее большую теоретическую и практическую значимость. Они позволяют не только обосновать и унифицировать подход к созданию и промышленному внедрению перспективных препаратов на основе фибриллярных белков, а также и предложить нетрадиционные, но весьма эффективные, экономически и экологически целесообразные способы переработки отходов коже-

венного, мясоперерабатывающего и шерстеперерабатывающего производств.

Цель и задачи исследования. Цель работы - разработать экологически безопасные способы получения нативных фибриллярных белков из белоксодержащих отходов кожевенного, мясоперерабатывающего и шерстеперерабатывающего производств и создать на их основе биологически активные препараты и биоматериалы нового поколения для нужд ветеринарии, медицины, косметологии и др. отраслей народного хозяйства.

В задачи исследования входило:

- изучить особенности и установить закономерности химического состава и строения различных видов белоксодержащих отходов животного сырья как многокомпонентной системы, состоящей из различных классов биополимеров и характеризующейся определенными энергетическими параметрами;

- разработать и оптимизировать методические приемы, позволяющие целенаправленно получать высокоочищенные препараты нативных фибриллярных белков из различных видов белоксодержащих отходов;

- предложить информативную систему контроля состояния исходного сырья, процессов наработки и оценки качества готовых белковых препаратов;

- разработать и воспроизвести в производственных условиях технологии получения фибриллярных белков;

- используя фибриллярные белки в качестве биологически активных матриц и совмещая их с известными лекарственными средствами направленного действия, создать более эффективные и стабильные формы препаратов и биоматериалов ветеринарного, косметического, медицинского и иного назначения.

Научная новизна. Сформулирован общий подход, позволивший на основе комплексного изучения фибриллярных белков, образующих основу гистологических структур различных видов сырья и отходов животного происхождения, предложить новые концепции их наработки, разработать методические приемы, направленные на решение проблемы стандартизации препаратов фибриллярных белков, показать перспективы и возможности их использования.

В диссертации получены следующие научные данные:

- впервые проведено исследование различных видов отходов кожевенного, мясоперерабатывающего и шерстеперерабатывающего производств с точки зрения целесообразности их использования в качестве исходного сырья для наработки фибриллярных белков; в этой связи дана количественная оценка химического состава отходов с учетом содержания в них отдельных классов биополимеров; экспериментально установлены энергетические параметры (энергия связей, их количество, спектр и др.), отвечающие за межмолекулярное взаимодействие биополимеров и, тем самым, обуславливающие особенности строения различных видов исходного сырья; предложены способы, с помощью которых определены биологические показатели, характеризующие качество используемого сырья, в том числе, степень бактериальной обсемененности;

- разработаны и запатентованы методы выделения коллагена, эластина и кератина из отходов животного сырья, на основе которых созданы технологии наработки этих белков в производственных условиях;

- предложены объективные методы контроля технологических процессов и оценки качества сырья и готовых препаратов фибриллярных белков по содержанию в них коллагена, неколлагеновых белков, углеводных компонентов (гексоз и гексозаминов), жировых веществ, по термодеформационным характеристикам, по агрегативной стабильности и др. показателям;

- впервые создан, экспериментально изучен, апробирован, внедрен ряд новых препаратов, материалов и средств различных форм и назначений на основе коллагена, эластина и кератина, в том числе:

  - антистрессовый препарат пролонгированного действия "Аминакол" (А.С. СССР № 1254999);
  - комплекс водорастворимых витаминов пролонгированного действия для повышения естественной резистентности и иммунобиологической реактивности животных (А.С.СССР № 1508371);
  - коллагеновые пленки, содержащие мотивационные сыворотки, гиалуро-

новую кислоту, антибиотики, антиникотиновые добавки;

- гемостатическая мазь с ε-аминокапроновой кислотой;
- растворы для инъекций, содержащие цитостатики различной химической природы, иммобилизованные на коллагене;
- коллагеновый биоматериал (А.С. СССР № 1622990);
- коллагеновый микроноситель для псевдосуспензионного культивирования перевиваемых клеток (А.С. СССР № 1559702, патент РФ 2007451), для очистки спорозоитов эймерий от примесей (патент РФ № 2059711);
- коллагеновый сорбент для аффинной хроматографии; в частности, для получения фибронектина (А.С. СССР № 1124230);
- коллаген, эластин и кератин косметического назначения (патенты РФ № 2031597, 2129805, 2092071, 2092072,) и косметические средства для ухода за кожей лица и волосами, содержащие коллаген, эластин и кератин;
- коллагеновый шлихтовальный раствор для текстильной промышленности.

Теоретическая значимость и практическая ценность работы. Проведенные комплексные исследования и полученные результаты позволили:

- обосновать целесообразность нового, экономически выгодного, способствующего нормализации экологической обстановки, направления в области переработки и рационального использования белоксодержащих отходов сырья животного происхождения;
- рассматривать белоксодержащие отходы, учитывая их объемы и биологическую ценность, как уникальное белково-углеводное сырье;
- сформулировать концепцию интенсивной экологически безопасной технологической переработки недубленых белоксодержащих отходов и побочных продуктов кожевенного, а также мясоперерабатывающего и шерстеперерабатывающего производств в биологически активные препараты фибриллярных белков;
- обосновать в рамках данной концепции возможность создания на основе

фибриллярных белков нового поколения препаратов направленного действия;

- разработать методические приемы, направленные на решение проблемы стандартизации препаратов, получаемых из отходов животного сырья.

Основные положения диссертационной работы включены (на правах соавтора) в нормативно-техническую документацию на препараты **Аминакол** (ТУ 10.07.210-91 и Временное наставление по применению в ветеринарии – утв. Главным управлением ветеринарии с государственной ветеринарной инспекцией при Госкомиссии СМ СССР по продовольствию и закупкам, 1991 г.), **Витакол** (ТУ и Временное наставление по применению в ветеринарии - утв. Департаментом ветеринарии Министерства сельского хозяйства и продовольствия РФ, 1996 г.), **Коллаген ПК** (ТУ 64-19-103-91), а также **Коллаген косметический** (ТУ 64-19-201-93), **Эластин косметический** (ТУ 64-19-200-93), **Кератин косметический** (ТУ 64-19-202-93).

Лекарственный состав **Аминакол** награжден дипломом выставки «Изобретательство и Рационализация – 88», серебряной медалью ВДНХ СССР и рекомендован Госагропромом СССР для внедрения в сельское хозяйство (Госагропром СССР, ВАСХНИЛ, ВНИИТЭИ, 1988 г.). **Коллаген ПК, Коллаген, Эластин и Кератин косметические** разрешены к применению Союзпарфюмерпромом СССР.

Наиболее **значимым практическим результатом** явилось осуществление в условиях производства технологий наработки коллагена, эластина и кератина косметического назначения. Качество препаратов подтверждено гигиеническими сертификатами, выданными Центром гигиенической сертификации парфюмерно-косметической продукции НИИ медицины труда РАМН при Государственным комитете санитарно-эпидемиологического надзора РФ (соответственно, №.1-11/К-1715, № 11/83-106, № 11/83-105).

Теоретические положения, сформулированные в работе, ряд экспериментальных результатов и предложенных методов включены в "Методические рекомендации по определению показателей качества кожевенного и шубно-мехового сырья" (М: ВАСХНИЛ, 1986 г.), в качестве учебного материала - в

методические указания "Определение углеводных компонентов (гексоз и гексозаминов) в образцах сырья, полуфабриката и, готовой кожи и модифицированных коллагенсодержащих материалах" (М: МВА, 1984), "Получение растворов коллагена I типа" (М: МВА,1985), "Способ определения бактериальной обсемененности сырья животного происхождения" (М: МВА, 1987). Они используются также при чтении лекций и проведении практических занятий по курсу "Основы научных исследований и патентоведения", при выполнении научно-исследовательских, курсовых и дипломных работ на факультете товароведения и экспертизы сырья животного происхождения МГАВМиБ им. К.И.Скрябина, в лаборатории кетгута и животного сырья ВНИИ технологии кровезаменителей и гормональных препаратов Минмедпрома СССР (1985 г.). "Способ обнаружения антител к коллагену" (№ 115-28/335-470), признанный Главным ветеринарным управлением МСХ СССР рационализаторским, применяется на кафедре и в лаборатории товароведения и технологии животного сырья (1984 г.) и в лаборатории иммунохимии Института экспериментальной кардиологии ВКНЦ СССР (1985 г.).

Результаты исследований нашли свое отражение в 11 изобретениях, новизна которых подтверждена 5 авторскими свидетельствами и 6 патентами , 2-х рационализаторских предложениях, 1 методических рекомендациях, 3 методических указаниях, и в 52 опубликованных работах.

Автор защищает:

- новое научное направление в области переработки и рационального использования белоксодержащих отходов и побочных продуктов кожевенного, мясоперерабатывающего и шерстеперерабатывающего производств, позволяющее рассматривать белоксодержащие отходы как уникальное сырье для наработки фибриллярных белков;

- способы целенаправленной модификации различных видов белоксодержащих отходов животного сырья, дающие возможность с учетом их вида, состава и свойств, получать высокоочищенные препараты коллагена, эластина и кератина;

- систему контроля свойств исходного сырья, процессов наработки и оценки качества готовых препаратов фибриллярных белков по комплексу физико-химических, химических и биологических показателей;

- новые препараты, материалы и средства различных форм и назначений, созданные на основе фибриллярных белков и критерии оценки их качества.

Апробация работы. Основные положения и результаты диссертации представлены и обсуждены на:

- V Всесоюзной конференции "Физиология и патология соединительной ткани", СО АМН СССР (Новосибирск, 1980);

- конференции молодых ученых по физико-химической биологии, АН Азербайджанской ССР (Баку, 1981);

- X Европейском конгрессе ревматологов, АМН СССР (Москва,1983 г.);

- Всесоюзном симпозиуме "Биохимия с.-х. животных и Продовольственная программа", АН СССР, Госагропром СССР, ВАСХНИЛ (Ташкент,1986 г.);

- III Всесоюзной научно-технической конференции "Актуальные проблемы производства кровезаменителей, консервантов крови, гормональных и органотерапевтических препаратов", Мин. мед. биопром. СССР (Москва, 1987 г.);

- Всесоюзной научно-технической конференции "Применение биотехнологий в животноводстве, растениеводстве и ветеринарной медицине", Центральное и Ленинградское областное правление НТО сельского хозяйства (Ленинград, 1988 г.);

- II Всесоюзной конференции "Пути повышения эффективности использования вторичных полимерных ресурсов", ВХО, ГКНТ СМ СССР и др. (Кишинев, 1989 г.);

- конференции "Актуальные проблемы ветеринарной и зоотехнической науки в интенсификации животноводства", посвященной 70-летию МВА, ГК СМ СССР по продовольствию и закупкам (Москва, 1989 г.);

- Всесоюзной научно-практической конференции "Интенсификация сельскохозяйственного производства в условиях радикальной экономической реформы", ЦП ВЭО, ЦП ВА НТО (Сумы, 1989 г.);

- II, III, IV, V, VI Российских национальных конгрессах " Человек и лекарство" МНТП РФ, МЗ и МП РФ (Москва, 1995, 1996, 1997, 1998, 1999 гг.);

- I и II научно-практических конференциях "Биологически активные вещества и новые продукты в косметике" РПКА (Москва, 1996, 1997 гг.);

- межрегиональной научно-практической конференции “Развитие меховой промышленности России”, ОАО “НИИМП” (Москва, 1999 г.);

- XII международных плехановских чтениях, РЭА (Москва, 20-22 апреля 1999 г.);

- на научно-практической конференции "Клинический опыт и проблемы коллагенопластики", ММА им. И.М.Сеченова (Москва, 29 октября 1999 г.);

- ежегодных научных конференциях факультета товароведения животного сырья МВА (1979- 1999 гг.).

Публикации. Основные результаты исследований опубликованы в 43 статьях.

Объем диссертации. Работа изложена на 279 страницах машинописного текста, включает 58 таблиц, 55 рисунков, состоит из введения, обзора литературы, пяти глав экспериментальной части, выводов, списка литературы, содержащего 422 источник (в т.ч. 215 работ иностранных авторов) и приложений о внедрении результатов работы в производство, лабораторную практику и учебный процесс.

Глава 1. Современные представления о строении и свойствах фибриллярных белков

Коллаген, эластин и кератин, представляющие собой предмет данного исследования, можно отнести к склеропротеинам – белкам, выполняющим в организме, главным образом, структурные функции и играющим огромную роль в образовании покровных тканей и скелета животных (2, 62, 76, 106, 111, 112, 113, 190, 347). Так как эти белки макроскопически являются волокнистыми, то их еще называют фибриллярными. Фибриллярные белки чрезвычайно инертны по сравнению с другими видами белков; например, на них часто совершенно не действует вода, разбавленные кислоты, щелочи или обычные протеолитические ферменты, по крайней мере, в природных условиях. По всей вероятности, это напрямую связано с их функциональными особенностями.

Благодаря большому практическому значению фибриллярных белков, их свойства изучались более интенсивно, чем какого-либо другого класса белков.

На первых этапах для изучения фибриллярных белков применялись такие химические и физические методы исследования, как аминокислотный анализ, рентгенография, спектроскопия, электронная микроскопия, благодаря которым удалось выявить специфические различия в аминокислотном составе отдельных белков (табл.1), а также общие особенности их строения.

Таблица 1

Особенности аминокислотного состава фибриллярных белков (62)

Аминокислота	Количество аминокислоты, г на 100 г белка		
	коллаген	эластин	кератин шерсти
Цистин+цистеин	2,3	0	**11,9**
Пролин+оксипролин	**29,1**	12,3	9,5
Глицин	**27,1**	32,8	6,5
Аланин	9,5	**22,7**	4,1

Предложенная в свое время Астбери и его сотрудниками (111) классификация фибриллярных белков, основанная на рентгенографических данных, позволила разделить все известные структурные белки на две основные группы:

- кератина – миозина – эпидермина – фибриногена;

- коллагена.

Особое, промежуточное место занимают эластин, актин мышц и фиброин шелка.

Следует отметить, что идентификация отдельных представителей указанных выше групп по рентгенографическим и спектрографическим параметрам оказалось гораздо более плодотворной, чем другие классификации, так как позволила предложить модели структурной организации фибриллярных белков, несмотря на их значительные отличия друг от друга по аминокислотному составу, химическим и физическим свойствам и функциям (76,189, 219, 359, 360, 392).

До недавнего времени главным и весьма серьезным с биохимической точки зрения препятствием в исследовании склеропротеинов считалось отсутствие возможности очистить фибриллярные белки или выделить из них химически гомогенный продукт. Эта трудность, по всей вероятности, обусловлена тем, что многие структурные белки по своей природе гетерогенны in vitro. Поэтому необходимо четко дифференцировать морфологические и биохимические термины, характеризующие закономерности организации фибриллярных белков от молекул до макроструктур (156, 158, 375).

В настоящее время успешно преодолеваются традиционные представления о фибриллярных белках как об инертных системах.

Особенности химического состава, специфическое расположение функционально активных групп, четкая пространственная структура фибриллярных белков обеспечивают особенности архитектоники содержащих их тканей и выполнения этими тканями определенных функциональных задач. Все это позволяет говорить об активной роли фибриллярных белков в процессах эмбриогенеза, морфогенеза, цитодифференциации, регенерации, иммунных реакциях (368, 371, 374, 375, 392).

Обзор состояния проблемы на уровне современной информации в мировой литературе по каждому из изучаемых фибриллярных белков представлен ниже.

1.1. *Коллаген.*

Коллаген является одним из наиболее распространенных в природе высокомолекулярных соединений. Он относится к классу белков, именуемых склеропротеинами (98,115).

В некоторых тканях коллаген является преобладающим органическим веществом. Он составляет более 30 % общей массы белков тела млекопитающих, причем около 40 % его находится в коже, до 50 % в тканях скелета и 10 % в строме внутренних органов (156).

Будучи основным структурным компонентом, практически всех разновидностей соединительной ткани, коллаген во многом определяет ее важнейшие физиологические функции: механическую, трофическую, защитную и пластическую (84, 85, 303, 367).

Как и все белки, коллаген имеет несколько уровней структурной организации (218). Под первичной структурой коллагена понимают природу, количество и чередование α-аминокислотных остатков, участвующих в образовании полипептидных цепей путем последовательного связывания друг с другом (227, 268, 298, 366). Вторичная структура, под которой следует понимать спиралевидную конформацию индивидуальной полипептидной цепи, определяется прежде всего стереохимическими факторами: конфигурацией аминокислотных остатков, в частности, своеобразной конфигурацией пятичленных пирролидиновых колец пролина и оксипролина, пространственной ориентацией валентных сил, образующих пептидные связи, ригидностью этих связей (238, 262, 265, 344, 374, 375).

Спонтанным следствием первичной и обусловленной ею вторичной структуры является третичная молекулярная структура коллагена, т.е. соединение спирализованных индивидуальных цепей в регулярную трехспиральную спираль (85, 101, 105, 236, 377).

Следующая ступень в структурной организации коллагена – четвертичная – обуславливает переход к надмолекулярным образованиям, основной формой которых являются фибриллы, представляющие собой сложные упорядоченные

агрегаты молекул коллагена. Отличием коллагена от других белков является то, что четвертичные элементы объединяются между собой в более крупные частицы высших структурных уровней, называемые волокнами (30, 49, 200, 230, 246, 278, 349).

Процесс формирования волокнистой структуры происходит при участии протеогликанов и гликопротеинов, являющихся неколлагеновыми компонентами экстрацеллюлярного матрикса (33, 47, 211, 214, 259, 323, 329, 352, 391).

Результатом всей описанной выше очень сложной суммы взаимодействий является возникновение морфологических структур, размеры и расположение коллагеновых волокон, которые характерны для отдельных разновидностей соединительной ткани (200, 360, 375).

На четвертичную, а также микроструктуру оказывает влияние не только вид организма или характер его ткани, но и многие другие факторы, например возраст (101,355).

Следует подчеркнуть, что термин "коллаген" в известной степени является собирательным. Им обозначают как специфические белковые молекулы, так и агрегаты этих молекул, образующие в соединительной ткани волокнистые фибриллярные структуры (282). Однако нередко в биохимической и морфологической литературе о коллагене в одни и те же термины вкладывают разное содержание. Поэтому необходимо дифференцировать коллаген как биохимическое понятие (молекулы, полимеризующиеся в фибриллы) и как морфологическое понятие (гетерогенное с химической точки зрения коллагеновое волокно) (156).

Исходя из этого, в табл.2 приводятся определения основных молекулярных и надмолекулярных структур коллагена в современном понимании (156).

Существует обширная литература по коллагену. За последние годы получены новые, весьма важные данные, позволившие развить прежние представления о биохимическом составе, молекулярной структуре, гетерогенности, биосинтезе и сборке этого белка, его практическом использовании, поставлены новые еще не решенные вопросы (71, 160, 220, 225, 233, 236, 249, 266, 306, 326,

349, 365, 369, 397, 405).

Современная коллагенология берет свое начало с работ Н.В Ореховича с соавт. (104,105). Благодаря этим исследованиям стало возможным получение

Таблица 2.

Основные молекулярные формы коллагена

Современная номенклатура	Устаревшие или неточно употребляемые термины	Содержание термина
Проколлаген	Проколлаген	Растворимый внутриклеточный предшественник коллагена, имеющий концевые пропептиды
Проколлаген		Негидроксилированная форма коллагена, выделяемая в условиях дефицита ряда факторов (O_2, Fe_2, витамин С и др.)
Коллаген		Молекулы коллагена после внеклеточной модификации (отщепления пропептидов)
Тропоколлаген		Идентичен коллагену
Кислоторастворимый коллаген	Проколлаген	Форма, растворимая в слабых кислотах вследствие неразвитости поперечных связей
SLS и FLS		Специфические формы полимеризации молекул коллагена in vitro
Фибрилла (нативная)	Волокно, микрофибрилла	Нерастворимая форма полимеризации молекул коллагена 14-300 нм., периодичностью 64-70 нм. В ней различают субфибриллы 5-10 нм., редко протофибриллы или филаменты 1,5-3 нм.
Микрофибрилла	Филамент	Изолированные тонкие структуры толщиной 10-20 нм. без поперечной исчерченности
Волокно		Пучки фибрилл, чаще однонаправленных, толщиной 0,5-10 мкм (видны в световом микроскопе)
Пучок волокон	Волокно	Пучки параллельных или переплетающихся волокон толщиной до 150 мкм

молекулы коллагена как дискретной единицы, ее химическое и физико-химическое изучение. Большинство данных, которыми мы располагаем в настоящее время в отношении биохимии коллагена, были получены на основе изучения "растворимого" коллагена.

Огромную роль в изучении коллагена сыграл анализ его довольно своеобразного аминокислотного состава (115, 227, 268, 298). Для него характерно, что каждая третья аминокислота в полипептидной цепи является глицином. Так что формулу коллагена можно изобразить в виде **[ГЛИ-X-Y]$_n$**. В коллагене в большом количестве содержатся практически не встречающиеся в других белках имино- и оксиаминокислоты: до 23 % от общего числа звеньев. Поэтому в положении **X** часто оказываются пролин и оксипролин.

Важным этапом в познании строения коллагена стала расшифровка первичной структуры его отдельных пептидных цепей, называемых α-цепями и содержащих по 1050 аминокислотных остатков (307, 374).

Оказалось, что концевые участки α-цепей на **N**- и **C**- концах молекулы (телопептиды) имеют отличный от основной части аминокислотный состав. Они не содержат пролина и оксипролина и не имеют глицина в каждой третьей позиции и поэтому не принимают участие в образовании тройной спирали. Однако именно они играют важную роль в механизме полимеризации молекул, формировании межмолекулярных поперечных связей, антигенных свойств коллагена (98, 101, 366).

Молекулярная масса α-цепей составляет примерно 95 килодальтон, а всей молекулы – около 300 килодальтон, длина макромолекулы составляет 280 нм, диаметр-1,4 нм (158, 201, 211).

Изучение продуктов частичного гидролиза коллагена с целью выяснения чередования аминокислотных остатков в его полипептидных цепях показало (98,115, 278, 292, 298), что для первичной структуры коллагена характерно наличие так называемых кристаллических сегментов, построенных преимущественно из неполярных аминокислот (остатков пролина и оксипролина, глицина и некоторых аминокислот с неполярной боковой цепью) и аморфных неупорядоченных сегментов, содержащих большое число полярных аминокислотных остатков (дикарбоновых и диаминокислот, а также оксиаминокислот жирного ряда), несущих положительный или отрицательный заряд.

Регулярность чередования кристаллических и аморфных областей объясня-

ет периодичность светлых и темных зон, видимых в электронном микроскопе (98, 220, 309).

Кроме аминокислот в молекуле коллагена содержится небольшое количество углеводных компонентов. При этом только гексозы и, вероятно, сиаловые кислоты являются составной частью коллагена (115, 158). Углеводная часть молекулы представлена моно- и дисахаридами, содержащими глюкозу или галактозу и соединенными О-гликозидной связью с остатками оксилизина (101). Именно поэтому коллаген относят к гликопротеидам.

Важнейшим достижением последних лет является открытие гетерогенности коллагена (84, 161, 200, 212, 232, 233, 350). Из разных тканей выделены семь генетически различных типов коллагена, (табл.3) отличающихся по аминокислотному составу и физико-химическим параметрам, но имеющих одинаковую молекулярную массу. Это различие обусловлено существованием нескольких разновидностей α-цепей, которые кодируются разными генами. Представленные в табл. 3 типы коллагена не исчерпывают все его многообразие. Имеются сведения о существовании особой формы коллагена (М-коллагена), тесно связанного с плазматической мембраной фибробластов и отличающегося от интерстициальных (84).

Биологическое значение гетерогенности коллагена, очевидно, состоит в обеспечении структурной организации отдельных разновидностей соединительной ткани, соответствующей их функциональной роли в организме (161).

Молекулярная модель коллагена была создана благодаря использованию широкого круга методик, включая рентгеноструктурный и спектральный анализ, поляризационную дифрактометрию, расчет межатомных расстояний, углов валентностей, подвижности цепей (31, 32, 188, 220, 236, 238, 262, 344,349, 375, 377, 409).

В настоящее время общепринятым считается представление о молекуле коллагена, как о трехспиральной спирали (377). Наличие минимум трех цепей в макромолекуле коллагена связано со структурной необходимостью выделить

Таблица 3

Свойства типов коллагена (212)

Тип коллагена	Состав	Местонахождение	Характерные черты
I	$[\alpha 1\ (I)]_2\ \alpha_2$	Кожа, кость, сухожилие, роговица	Присутствие α2-цепи, менее 10 оксилизилов на цепь, до 0,5 % углеводов
Тример I	$[\alpha 1\ (I)]_3$	Культивируемые хондроциты, клетки амниотической жидкости	То же, но отсутствует α2-цепь
II	$[\alpha 1\ (II)]_3$	Хрящ, стекловидное тело	Более 20 оксилизилов на цепь, до 10 % углеводов
III	$[\alpha 1\ (III)]_3$	Эмбриональная кожа, стенки сосудов, гладкая мышца	Наличие цистеина, много оксипролина, гистидина
IV	α1 (IV), α2 (IV)	Базальные мембраны	Более 20 оксилизилов на цепь, до 13 % углеводов, много оксипролина, не процессируется
V	αA, αB	То же	Мало оксипролина, отсутствует цистеин
VI	αC, αD	- " -	Много оксилизина, Д-цепь с цистеином, С-цепь без цистеина
VII		- " -	22 % углеводов, устойчивость к коллагеназе при 20 °С, сильная иммуногенность, повышенная стабильность молекулы

каждую третью позицию в каждой цепи для остатков глицина (374). В этом случае боковые цепи пролина и оксипролина также могут размещаться рядом в соседних позициях, что обусловлено существованием последовательности **гли-про-оксипро**.

Сложная трехспиральная молекула упорядочена таким образом, что свободные боковые цепи глицина каждой полипептидной цепи находятся внутри общей спирали, а кольца пролина, оксипролина, и боковые группы аминокислот выступают наружу. Исследование синтетических аналогов коллагена показало, что наличие в первичной структуре коллагена пролина и оксипролина, а также последовательности типа **гли-про-оксипро** спонтанно определяет трехспиральную форму молекулы (31, 227, 266).

Завершая рассмотрение основных черт молекулярной структуры коллагена,

следует также упомянуть об исследованиях, посвященных механизмам, соединяющим и удерживающим три спиральные цепи тропоколлагеновой молекулы в их упорядоченном состоянии. Рядом авторов (31, 35, 44, 49, 191, 193, 202, 262, 366, 374, 375, 389, 390, 402) было показано, что стабильность трехспиральной структуры макромолекулы обеспечивается, главным образом, водородными связями, имеющими межспиральный характер. Кроме того, она стабилизирована комплексом электростатических и гидрофобных связей.

Особое место в структурной стабилизации коллагена отводится телопептидам – коротким односпиральным полипептидным цепям, выступающим в виде "хвостиков" из тела молекулы. По мнению (388), два коротких пептида соседних молекул скручиваются вместе и участвуют в линейной полимеризации макромолекул из конца в конец с образованием протофибрилл. Вначале предполагалось, что телопептиды находятся с двух концов трехспиральной молекулы. Однако на основании результатов определения концевых групп был сделан вывод, что пептидные "хвостики" имеются не только на концах молекулы, но вероятно, торчат наружу по всей длине макромолекулы (201). Результаты последующего изучения бромциановых пептидов показали, что так называемые телопептиды являются концевыми остатками α_1- и α_2- цепей молекулы коллагена, не образующих тройной спирали.

Размер белковой молекулы, особенности первичной структуры коллагена отражаются на сравнительном разнообразии его антигенных детерминант. Экспериментально доказано существование трех различных типов антигенных детерминант в молекуле коллагена: спиральных, концевых и центральных (281, 404). Антигенные детерминанты спиральных областей находятся в трехспиральной зоне молекулы, их нельзя обнаружить в раскрученных α-цепях, например, при тепловой денатурации. Концевые антигенные детерминанты расположены в неспиральных участках и единственной возможностью их идентификации является неустойчивость ферментов. Третья группа антигенных детерминант локализуется на аминокислотных участках, образующих тройную спираль и поэтому стабильных к протеазам, так как эти участки в основном скрыты

внутри трехспиральной структуры, но оказываются снаружи при денатурации, для них был предложен термин "центральные" антигенные детерминанты.

Как отмечалось выше, линейная агрегация макромолекул коллагена является первым этапом сложного процесса, ведущего к полимеризации их в фибриллы. Межмолекулярные взаимодействия происходят постепенно: вначале путем стабилизации структуры фибрилл за счет водородных, ионных, гидрофобных и других слабых связей, в дальнейшем возникают прочные внутри- и межмолекулярные связи (44, 49, 98, 191, 193, 319, 332, 375, 389, 402).

Процесс образования поперечных ковалентных связей в коллагене идет непрерывно: он начинается с возникновения β- и γ- компонентов молекулы из α-цепей, появления межмолекулярных связей с образованием ди-, -три- и полимерных структур и заканчивается формированием непрерывной сети связанных между собой пептидных цепей, в которой теряются границы отдельных молекул, что и обуславливает нерастворимость зрелого коллагена (278, 238, 332, 389, 402, 414).

В межмолекулярной стабилизации коллагена принимает участие углеводные компоненты (46), липиды (50), вода (31, 32).

Наибольшее значение в формировании четвертичной (фибриллярной) структуры коллагена имеют гликозаминогликаны (33, 47, 50, 211, 323.). В соединительной ткани они существуют в виде комплексов с белками (протеогликанов). Накопление кислых гликозаминогликанов (гиалуроновой кислоты, хондроитинсульфатов) происходит там, где идет активный фибриллогенез: в эмбриональной ткани, при заживлении ран и т.д. (158, 323, 329). Известно также, что большое значение в реконституции волокон из раствора коллагена in vitro имеют кислые гликозаминогликаны (хондроитинсульфаты, гепарин и др.), состав, качество и степень полимеризации, которых определяют толщину, структуру и стабильность волокон (352). Большинство исследователей считают, что фибриллообразование *in vitro* происходит посредством электростатического взаимодействия между анионными группами гликозаминогликанов и катионными группами коллагена. На характер взаимодействия влияет концентрация,

ионная сила и pH исходных растворов, причем фибриллообразование может происходить не только при кислом, но и при нейтральном pH, т.е. в физиологических условиях (352), что подтверждают данные о роли полисахаридов в фибриллогенезе *in vivo*.

Заканчивая рассмотрение уникальных особенностей молекулярной и надмолекулярной структуры коллагена и переходя к вопросам, связанным с солюбилизацией коллагена, мы считаем необходимым отметить, что именно прогресс в изучении структуры коллагена явился предпосылкой для подобного рода исследований.

Нерастворимость зрелого коллагена в обычных для белков растворителях обусловлена наличием трехмерной сетки ковалентных межмолекулярных связей. В настоящее время найдены методы разрушения этих связей в условиях, сохраняющих трехспиральную структуру тропоколлагена. В результате происходит "деполимеризация" зрелых фибрилл и нерастворимый ранее коллаген удается перевести частично или полностью в раствор.

Продукты растворения коллагена (ПРК) можно разделить на две группы. К первой относится коллаген, получаемый непосредственно экстракцией соединительной ткани (104,105), ко второй группе – коллаген, который удается перевести в ПРК лишь после предварительной химической, ферментативной или механической обработки зрелого нерастворимого коллагена (10, 41, 42, 97, 98, 170, 171, 173).

Особый интерес вызывает предварительная обработка зрелого коллагена щелочью в присутствии соли с последующим растворением в уксусной кислоте. Этот метод позволяет сравнительно быстро и с небольшими затратами получить большое количество продуктов растворения зрелого коллагена, пригодного для получения технических и медицинских изделий. Авторы (156), изучавшие изменение волокнистой структуры коллагена в процессе щелочно-солевой обработки методами гистохимии и электронной микроскопии, отмечают расщепляющее действие щелочи на межмолекулярные связи или вещества, их образующие, что приводит к постепенной дезорганизации и разрушению

коллагеновых пучков, а затем к деструкции и гомогенизации самих коллагеновых волокон. При этом ослабляется и исчезает двойное лучепреломление, свойственное упорядоченной структуре коллагена и усиливается чувствительность к коллагеназе. Устойчивость к протеолитическим ферментам сохраняется, что свидетельствует о сохранении внутримолекулярной структуры коллагена.

Биохимические исследования (41, 122, 133, 201) подтверждают результаты гистохимических анализов о том, что предварительная щелочно-солевая обработка приводит к разрушению основного "цементирующего" вещества, в частности, кислых гликозаминогликанов и, тем самым, к нарушению межмолекулярных связей. Содержание оксипролина и общего азота в коллагене практически почти не изменяется в процессе его принудительного растворения, что косвенно свидетельствует об отсутствии выраженных химических изменений в макромолекулах.

В зависимости от вида обработки и условий растворения можно получать либо растворы полностью или частично денатурированного коллагена, либо растворы, близкие по своим свойствам к растворам нативного коллагена.

Изменение физико-химических свойств продуктов растворения коллагена по сравнению с известными данными для проколлагена служат критерием глубины изменений молекул тропоколлагена в процессе предварительной обработки и растворения зрелого коллагена.

Результаты исследований тщательно очищенных фильтрованием и отдиализованных разбавленных растворов коллагена обычно свидетельствуют об отсутствии заметной деструкции частиц коллагена (41, 201).

Степень повреждения молекулярной структуры в процессе подготовки коллагена к растворению, молекулярные параметры (молекулярная масса, размеры и форма частиц, оптическая активность и др.), а также изменения их при различного рода воздействиях (pH, температура, действие осадителей и т.д.) можно определить только при изучении физико-химических свойств растворенного коллагена, так как именно в растворах проявляются индивидуальные особенности макромолекул. Сопоставление физико-химических свойств и молекулярных

параметров солюбилизированного коллагена с известными данными для растворимых фракций позволяет однозначно решить вопрос о сохранении или разрушении в процессе предварительной обработки характерной для тропоколлагена конформации тройной спирали, а также о способности молекул растворенного коллагена реконстру ировать фибриллярные структуры (44, 49, 201).

Изучение процесса обратной реконституции волокнистого коллагена из растворов кроме выяснения вопросов молекулярного строения и надмолекулярной организации коллагена, определения «нативности» *in vivo* изучаемых макромолекул и понимания процесса фибриллогенеза тесно связано с различными аспектами приготовления разнообразных материалов на его основе.

Волокнистые образования можно выделить как из нативного, так и из солюбилизированного коллагена при добавлении к нему различных солей, органических растворителей, спиртов, полианионов, дубителей и других осадителей, а также с помощью различных видов сушки (42, 44, 98, 115).

После того как были разработаны методы перевода зрелого коллагена в растворимое состояние, появилось большое количество работ отечественных и зарубежных авторов по получению различных коллагеновых материалов (3, 4, 20, 45, 48, 58, 59, 60, 70, 72, 96, 140, 172, 177, 178, 179, 180, 225, 243, 249, 300, 327, 346, 365, 370, 372, 406, 412, 422).

Наиболее часто применяемые формы реконструируемого коллагена представлены в табл. 4.

Свойства, определяющие возможность широкого использования коллагена в медицинской и ветеринарной практике, суммированы в табл. 5.

Ассортимент и формы искусственных коллагеновых материалов постоянно увеличиваются. Уникальная молекулярная структура коллагена, наличие на его поверхности большого количества активных функциональных группировок, позволяют использовать его в качестве матрицы для иммобилизации биологически активных и лекарственных веществ, открывая путь к созданию фармакологических средств и изделий нового поколения (138, 143, 153, 154, 180, 225, 244, 261, 312, 345, 364, 365, 368, 369, 389, 405, 422). Получаемые при этом ком-

плексные препараты обладают, как правило, выраженным синергическим эффектом и пролонгированным действием.

Таблица 4

Формы искусственных коллагеновых материалов и их применение (237, 365)

Формы коллагена	Применение
Раствор	Заменитель плазмы. Восстановление мягких тканей (подкожно). Среда для культур клеток в трансплантационных исследованиях. Импрегнирование протезов.
Гель	Замена стекловидного тела, восстановление мягких тканей.
Порошок	Заживление ран. Гемостатический агент.
Пленка, пленочные мембраны	Пересадка роговицы. Гемодиализная мембрана. Клапанные протезы. Мембранные окислители. Перевязочные материалы для стимуляции заживления ран
Волокна, нити	Шовный материал, заменитель кетгута
Губчатые структуры	Перевязочные материалы. Гемостатические агенты. Хирургические тампоны. Противозачаточные средства

Таблица 5

Свойства коллагена, позволяющие использовать его в качестве биоматериала

Свойства	Показатели
Физико-механические	Высокая прочность на разрыв, низкая растяжимость, ориентация волокон
Физико-химические	Контролируемое поперечное соединение дубящими веществами, влияние на: растяжимость, набухание, резорбцию. Функции ионообменника: полупроницаемость мембран
Биологические	Низкая антигенность, воздействие на заживление ран, влияние на свертывание крови

Коллаген активно применяется в современной косметологии. Проникая в кожу, он блокирует свободные радикалы молекул, частично разрушенных в процессе старения и под влиянием агрессивных факторов внешней среды, стимулирует биосинтез собственного коллагена в организме (18, 118, 142, 208, 412).

Универсальность данного биополимера, его технологические возможности открывают новые перспективы и расширяют сферы применения коллагена и производных на его основе. Имеются многочисленные сообщения и патенты о применении коллагена в биотехнологии, пищевой, текстильной промышленности и других отраслях народного хозяйства (5, 6, 7,14, 117, 152, 162, 163, 165, 166, 168, 174, 175, 183, 187, 225, 335).

1.2 *Эластин.*

Как известно, волокнистые компоненты межклеточного матрикса представлены не только коллагеновыми, но и эластическими волокнами, которые имеют четкую ориентацию и упорядоченность на любом уровне своей структурной организации (219, 235, 258, 347, 379).

Эластические волокнистые структуры распространены преимущественно в органах и тканях, функция которых связана с большими деформациями под действием малых нагрузок с полным (эластическим) восстановлением формы после прекращения деформирующего воздействия (235, 248, 293, 305). Обратная деформируемость эластических волокон напоминает свойства резины. В тканях эластические компоненты встречаются в виде волокон (легкие, дерма, склера, вены, эластические связки, хрящ) и мембран (артерии). Например, в дерме эластические волокна содержатся в количестве 1-3% от массы всех волокнистых компонентов (156, 158, 358).

Благодаря использованию сканирующего электронного микроскопа было установлено (316, 317), что эластическая ткань выйной связки быка состоит из волокон цилиндрической формы диаметром 1-3 мкм, расположенных параллельно друг другу и ориентированных преимущественно вдоль длинной оси связки. В отдельных участках эти волокна переплетаются друг с другом или соединяются при помощи более тонких волокон. В свою очередь, эластические волокна связки, состоят из тонких фибрилл толщиной около 0,12 мкм. При этом каких-либо признаков регулярности ориентации, периодичности структуры волокон, как это имеет место для коллагена, обнаружить не удается.

Эластическая ткань средней оболочки артерий состоит в основном из кон-

центрических мембран, но не непрерывных, а образованных дугообразными пластинками, соединяющими между собой конец в конец и бок в бок (черепицеобразно), иногда через коллагеновые волокна или отростки гладких мышц. Оказалось, что эластическая ткань имеет волокнистое строение даже в мембранах сосудистой стенки. При изучении тонкого строения мембран было установлено, что они имеют упорядоченное волокнистое строение и состоят из эластических волокон толщиной 1-3 мкм, тесно прилегающих друг к другу и ориентированных в одном направлении: у человека под углом 30-40° к длинной оси сосуда, у животных - 75-90°. Волокна, составляющие пластину, могут сливаться, образуя гомогенные пластины или трехслойные пластины, в которых волокна наружных слоев частично погружены в гомогенный средний слой (235, 241, 321). Структурная гетерогенность мембран отражает сложную биомеханику их сокращения и, в целом, обеспечивает оптимальное сочетание эластичности и прочности сосудистой стенки при передаче пульсовой волны вдоль сосуда. Коллагеновые волокна при этом ограничивают степень однонаправленного натяжения эластических элементов и скольжение их относительно друг друга (258).

Ультраструктурное изучение эластических волокон позволило установить, что они состоят, по крайней мере, из двух различных компонентов: фибриллярного и аморфного, отличающихся восприятием катионовых и анионовых красителей. В электронном микроскопе зрелые эластические волокна и мембраны выглядят на продольном срезе в виде лентовидных структур различной толщины (от 200 до 5000 нм), в аморфном матриксе которых видны микрофибриллы диаметром 10-12 нм. (272, 296, 316). Они образуют густую сеть в краевых зонах волокна и сравнительно реже встречаются в центральных слоях. Аморфный компонент эластической ткани выявляется при специальных методах окраски орсеином, резорцин-фуксином.

Вопрос о природе компонентов эластических волокон долгое время являлся предметом постоянных дискуссий. Сейчас уже установлено, что аморфный компонент идентичен эластину, а микрофибриллярный образован гликопро-

теином, относящимся к классу структурных гликопротеинов (239, 264, 325). Функциональное значение двухкомпонентной структуры эластического волокна не вполне ясно. Считают (342, 382), что одной из функций микрофибрилл является морфогенетическая. Многочисленными исследованиями показано, что у эмбриона в развивающейся аорте, связках, коже, легких сначала появляются пучки микрофибрилл (239, 240). Пространство между ними постепенно заполняется сливающимися глыбками аморфного матрикса, который затем оттесняет микрофибриллы на периферию эластического волокна, занимая более 90% объема.

Микрофибриллярный компонент оказывает существенное влияние на биомеханические свойства эластических структур. По всей вероятности, каркас из микрофибрилл ограничивает степень растяжимости эластинового матрикса (264, 379, 383). Поэтому соотношение эластомерных и прочностных свойств волокон и мембран зависит именно от соотношения обоих компонентов. Это предположение нашло свое подтверждение в работах, посвященных изучению окситалановых и элауниновых волокон, которые представляют собой различные стадии развития эластических волокон (384). Так, окситалановые волокна состоят только из пучков микрофибрилл диаметром 10-12 нм. Элауниновые волокна содержат, кроме того, пакеты аморфного компонента (около 30-40% от всей массы волокон), а зрелые эластические волокна на 90% состоят из аморфного компонента.

Изучение всех типов волокон в различных тканях показало (264, 383, 385), что микрофибриллярный компонент преобладает там, где требования к механической прочности выше, чем к эластичности.

Основным белковым компонентом, из которого состоят эластические волокна, является эластин, на его долю приходится более 90% массы эластических волокон. Помимо эластина волокна содержат, как уже упоминалось выше, микрофибриллярный гликопротеин, а также небольшое количество гликозаминогликанов и липидов (380, 410).

Эластин – своеобразный белок, отличающийся от коллагена не только по

электронномикроскопическим и гистохимическим характеристикам, но и по химическому составу и молекулярной структуре (387, 395, 407).

С одной стороны, первичная структура эластина имеет некоторые общие черты с первичной структурой коллагена. Почти таким же, как в коллагене, является содержание глицина (около 1/3 общего числа аминокислотных остатков) и пролина. Общим для эластина и коллагена является наличие оксипролина, хотя количество оксипролильных остатков в эластине примерно в 10 раз меньше, чем в коллагене. Как и в коллагене, в эластине содержится крайне мало цистина, метионина, гистидина и отсутствует триптофан.

Вместе с тем, по своему аминокислотному составу эластин обладает весьма существенными отличиями от коллагена. Он содержит значительно меньше аспарагиновой и глутаминовой кислот и аргинина, а также гораздо больше валина и аланина. Отсутствие триптофана, малые количества цистина и метионина, высокое содержание валина и низкое, по сравнению с коллагеном, содержание оксипролина являются четкими критериями для идентификации этого белка в различных образцах соединительной ткани (158).

Главной особенностью эластина, отличающей его от всех других белков, является исключительная насыщенность первичной структуры неполярными аминокислотами (387): около 90% аминокислотных остатков обладают неполярными боковыми группами, лишь 2-3% приходится на долю положительно заряженных остатков аминокислот, таких, как лизин и аргинин, и 6-7 % - на долю аминокислот с отрицательно заряженными остатками боковых цепей (глутаминовой и аспарагиновой). В этом и заключается специфичность аминокислотного состава эластина, которая обусловливает его инертность по отношению к воде и различным химическим реагентам. Эластин во много раз меньше набухает в воде по сравнению с коллагеном, довольно устойчив к гидротермическим воздействиям и не обнаруживает эффекта денатурации в процессе нагревания (311, 407).

Первичная структура эластина расшифрована пока еще далеко не полностью. Установить последовательность остатков удалось лишь в небольших пеп-

тидных фрагментах молекулы растворимого предшественника зрелого эластина – тропоэластина (334, 343). При этом были обнаружены несвойственные другим белкам последовательности, например, тетрапептид **ГЛИ-ГЛИ-ВАЛ-ПРО-**, пентапептид **ПРО-ГЛИ-ВАЛ-ГЛИ-ВАЛ-**, гексапептид **ПРО-ГЛИ-ВАЛ-ГЛИ-ВАЛ-АЛА-.** Найдены были также остатки аланина, связанные с остатками лизина: **АЛА-АЛА-ЛИЗ-** и **АЛА-АЛА-АЛА-ЛИЗ**.

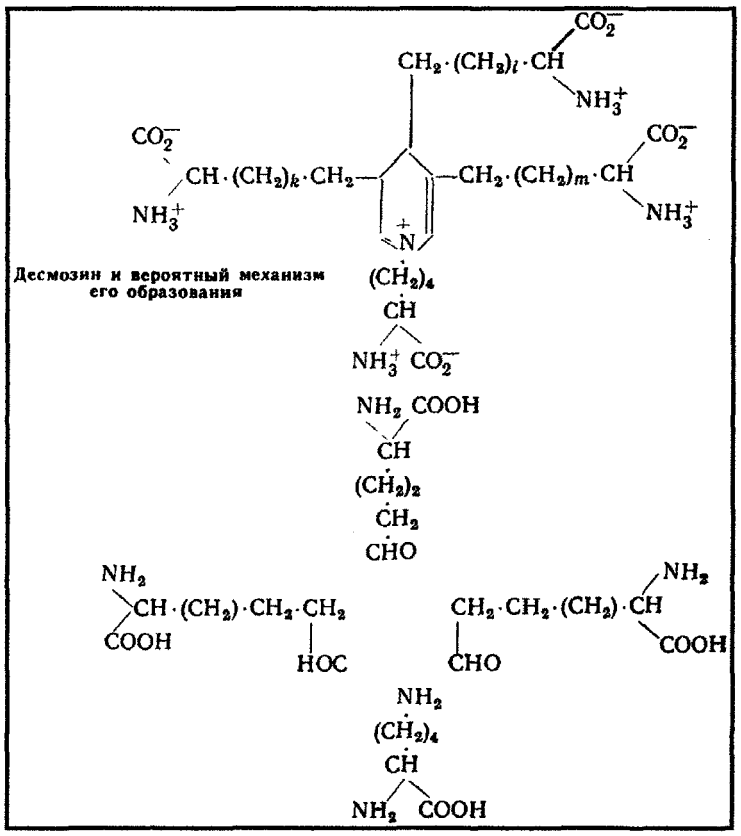
Таблица 6

Аминокислотный состав эластина и микрофибриллярного гликопротеина (в пересчете на 1000 остатков)

Аминокислоты	Эластин хряща	Эластин выйной связки	Эластин аорты	Микрофибриллярный гликопротеин
Гидроксипролин	11,7	8,1	10,5	0
Аспарагиновая кислота	21,4	5,8	6,5	114
Треонин	12,9	9,3	9,6	56
Серин	14,8	8,7	9,2	62
Глутаминовая кислота	35,7	15,4	15,9	114
Пролин	113,7	115,5	112,1	64
Глицин	307,3	328,1	330,8	110
Аланин	204,3	227,0	222,8	65
Валин	105,0	131,6	130,7	56
Полуцистеин	0	0	0	48
Метионин	0	0	0	16
Изолейцин	19,9	23,9	23,4	48
Лейцин	62,2	59,4	57,9	69
Тирозин	16,0	5,9	7,5	36
Фенилаланин	29,3	29,3	29,6	38
Лизин	7,3	7,3	4,6	45
Гистидин	0,7	0,5	0,5	15
Аргинин	14,3	5,8	5,9	45
Десмозины*	16,0	16,0	15,9	0

* В пересчете на лизин

Во фрагментах молекул зрелого эластина, содержащих лизин, и полученных путем последовательной обработки эластинсодержащих тканей эластазой, папаином, карбоксипептидазой, были обнаружены необычные для других белков соединения – десмозины (280, 296, 334). Было установлено, что эти компоненты формируются в результате конденсации четырех остатков лизина (299, 322).



Анализ десмозинов (их известно 4 - десмозин, изодесмозин, меродесмозин и дегидродесмозин) показал, что все они представляют собой тетракарбоксильные тетрааминокислоты. Благодаря такому строению каждая из этих кислот может одновременно входить в состав нескольких (до четырех включительно) полипептидных цепей, соединяя их между собой, т.е. играя роль ковалентной поперечной связи. Такие поперечные связи встречаются только в эластине, и именно их образование обуславливает превращение растворимого тропоэластина в нерастворимый эластин (272, 318, 328).

Эластин содержит и другие ковалентные поперечные связи (332, 362). В гидролизатах богатой десмозинами пептидной фракции была найдена еще одна новая аминокислота, названная лизиннорлейцин, которая является дикарбоксильной диаминокислотой и может быть, следовательно, связующим звеном, поперечной связью между двумя полипептидными цепями эластина, входя в состав обеих. Такую же роль в формировании поперечных связей выполняет дипептид, идентифицированный как дитирозин. В эластине трудно провести грань между аминокислотными остатками полипептидных цепей и функциональными группами, образующими поперечные связи между цепями.

Десмозины, дитирозин и лизиннорлейцин можно рассматривать как точки разветвления цепей (379).

Вероятно, перечисленные выше пептидные фрагменты не исчерпывают список компонентов, образующих поперечные связи в молекулах эластина. Например, существует мнение о том, что углеводы, в том числе гексозы, сиаловая и гексуроновая кислоты, могут служить мостиками между полипептидными единицами (391). Другие исследователи считают (219), что взаимодействие эластина с полисахаридами не может осуществиться вследствие незначительного содержания в молекуле боковых цепей с карбоксильными, амино- и оксигруппами, по которым обычно присоединяются полисахариды. Предполагают, что мукополисахариды не оказывают существенного влияния на стабилизацию эластина, хотя и играют важную роль в придании ему тягучести (158, 205, 316).

Молекулярные цепи эластина имеют очень большую длину. Подтверждением этому служит тот факт, что в 10^5 г эластина содержится только 0,29 моль N-концевых аминокислотных остатков (106). Предполагают, что длинные молекулярные цепи в эластине связаны между собой редкими межмолекулярными связями. По мнению ряда авторов (219, 241, 272, 296), это обусловлено чрезвычайной бедностью первичной структуры эластина полярными (основными и кислотными остатками). Несомненно, эта особенность имеет отношение к основному механическому свойству эластина, поскольку обратная деформируемость фибриллярного белка возможна только при том условии, что отдельные фибриллы могут обладать достаточной кинетической свободой по отношению друг к другу (305, 322).

Дальнейший прогресс в изучении молекулярной структуры эластина связан с выделением растворимых форм этого белка (182, 267, 304, 311, 322, 362, 363). Следует отметить, что α- и β-эластины - растворимые продукты, образующиеся при обработке тканей щавелевой кислотой, не являются, как оказалось, мономерными субъединицами белка. Удалось выделить из аорты свиней растворимый в солевых растворах белок, соответствующий по аминокислотному составу эластину, но не содержащий десмозинов. Этот белок, по аналогии с тро-

поколлагеном, получил название тропоэластина, так считали, что он является предшественником зрелого эластина (270, 343, 384). Впоследствии это полностью подтвердилось при изучении биосинтеза эластина в культурах клеток (358, 401, 419).

Для того, чтобы объяснить основное свойство белка - обратимую деформацию, были предложены различные модели его молекулярной организации.

В основе "энтропической" модели, предложенной еще в 40-х годах (219), лежат представления, согласно которым обратимая деформация эластина основана на наличии гомогенной сети беспорядочно ориентированных полимерных молекул, которые в расслабленном состоянии обладают значительной степенью "кинетической свободы". При натяжении упорядоченность такой структуры возрастает, что приводит к уменьшению степени "свободы" и стремлению к возрастанию энтропии, и это является причиной сокращения эластина при ослаблении физической нагрузки (248, 294).

Эта модель в известной степени согласуется с данными рентгеноструктурного анализа и ядерно-магнитного резонанса, а также с результатами термодинамических и физико-химических исследований эластина (296, 299, 305, 317, 342, 361).

Согласно корпускулярной модели (384, 392, 395), эластин состоит из отдельных глобулярных частиц размером около 5 нм, соответствующих по молекулярной массе индивидуальной молекуле тропоэластина (74000-75000 дальтон). Гидрофобные остатки повернуты внутрь глобулы, а гидрофильные остатки снаружи.

Эластин, растворимый в воде, представляет собой двухфазную систему, как бы состоящую из "капель масла", которые сопротивляются изменению положения. При натяжении сферические глобулы становятся элиптоидными и соприкасаются, что усиливает гидрофобность системы, за счет этого накапливается энергия для возвращения в свернутое исходное состояние.

Близка к описанной и модель, носящая название "масляная спираль." По мнению авторов (413), в ней вместо глобул имеются спирали с гибкими,

способными длительное время находиться в напряженном состоянии (за счет наличия десмозиновых и аналогичных им поперечных связей) участками.

В последнее время большое распространение получили филаментарные модели молекулярного строения эластина (407, 408). Методом электронной микроскопии установлено, что он состоит из парных, расположенных параллельно друг другу, нитей диаметром 1,5 нм, расстояние между которыми составляет 3-4 нм. Через каждые 3-3,5 нм имеются центры уплотнения, которые создают впечатление периодичности. При фиксации молекул эластина в состоянии натяжения толщина нитей возрастает (3-3,5 нм), что объясняется сближением нитей диаметром 1,5 нм друг с другом. Одновременно происходит увеличение длины периода между центрами уплотнения: она становится равной 4-4,5 нм. Такие наблюдения позволили предположить, что в зрелом эластине отдельные молекулы тропоэластина упорядочены в сеть параллельных друг другу цепей, попарно соединенных друг с другом при помощи ковалентных поперечных связей, в области которых формируются центры уплотнения, в то время как соседние пары не связаны между собой.

Филаментарные модели нашли свое развитие в последующих работах. В настоящее время появились убедительные данные (295), позволяющие утверждать, что надмолекулярная структура эластина включает в себя упорядоченные участки. Внутри образующих эластические волокна аморфных под световым микроскопом масс эластина методами электронной микроскопии и оптической дифракции выявлены образования, напоминающие канаты диаметром около 1,5 нм каждый; длину филаментов определить не удалось. Изучение синтетических пептидов, моделирующих фрагменты макромолекулы эластина, дало возможность установить, что филаменты спирализованы: небольшие (около 15% длины филамента) участки имеют конформацию жесткой α-спирали, однако большая часть (около 85%) представляет собой β-спираль, которая может растягиваться наподобие пружины с разрывом водородных связей между витками (рис.1).

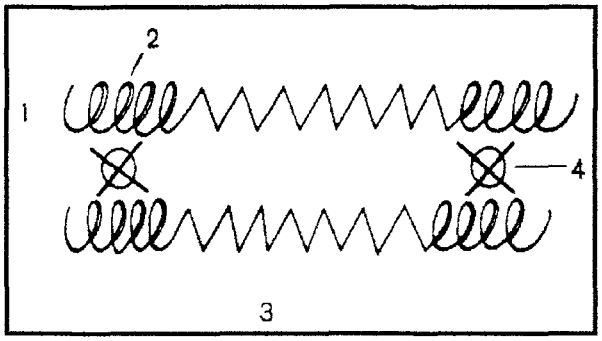


Рис.1 Фибриллярная модель структуры эластина: 1 - филаменты; 2 - участки альфа-спирали; 3 - участки бета-спирали; 4 - десмозины.

Длина таких растяжимых участков не может превышать расстояния между двумя ближайшими друг к другу ковалентными поперечными связями, в частности между десмозинами. Расчеты показывают, что это расстояние составляет в среднем 70 аминокислотных остатков; молекулярная масса такого участка равна примерно 6000. Эти данные существенно дополняют представления о природе эластичности эластина как следствие гидрофобности.

Тем не менее, ни одна из предложенных моделей молекулярного строения эластина, на наш взгляд, до сих пор не может считаться окончательной, поскольку каждая из них не вполне соответствует всем имеющимся экспериментальным данным. Возможно, молекулярная структура эластина включает в себя различные типы организации, описанные выше.

Благодаря успешному применению методов молекулярной биологии удалось выявить ряд биохимических закономерностей биосинтеза эластина (241, 258, 318, 334, 343, 358, 368, 401, 403). Из клеток тканей молодых животных, особенно богатых эластином (аорта, выйная связка), выделена и-РНК эластина, непосредственным продуктом трансляции которой, предшественником фибриллярного эластина, является полипептид с молекулярной массой около 70000, названный тропоэластином. Макромолекула тропоэластина, собранная на рибосоме, состоит из 850 аминокислотных остатков и сигнального пептида длиной в 24 остатка. Первичная структура этого гидрофобного пептида, обеспечивающая векториальный транспорт собираемой макромолекулы через мембрану гранулярного ретикулума, установлена: центральная часть насыщена

гидрофобными аминокислотными остатками, а N- и С-области содержат остатки полярных аминокислот.

Первичная структура основной части макромолекулы тропоэластина до настоящего времени расшифрована лишь частично. По некоторым данным (419), существуют две разновидности тропоэластина: **b** и **a.** Они лишь незначительно отличаются друг от друга по молекулярной массе (70000 и 73000) и аминокислотному составу (тропоэластин **a** содержит больше цистеина), обладают общими антигенными детерминантами (310). Биологическое значение наличия двух тропоэластинов остается невыясненным; предполагают, что они являются продуктами двух самостоятельных генов. Как правило, количественно преобладает тропоэластин **b**.

Макромолекулы тропоэластина транспортируются из цистерн гранулярного ретикулума в комплекс Гольджи, где они накапливаются в периферических везикулах, откуда затем секретируются в матрикс. В процессе внутриклеточного транспорта тропоэластин подвергается посттрансляционным модификациям. Это, во-первых, отщепление сигнального пептида и, во-вторых, гидроксилирование небольшого числа остатков пролина с образованием 4-гидроксипролилов (318).

Сборка эластических фибрилл происходит в матриксе. Как правило, она осуществляется при взаимодействии тропоэластина с микрофибриллярным гликопротеином. Возможно, что процесс протекает здесь по типу коацервации (239, 294, 299).

Как и у коллагена, структурная зрелость эластических структур достигается в результате формирования системы ковалентных поперечных связей. Превращение растворимого тропоэластина в нерастворимый эластин с химической точки зрения должно представлять собой процесс развития поперечных связей между полипептидными цепями (342, 361, 362). Поэтому нарастание содержания десмозина, изодесмозина и лизина в эластине в процессе онтогенеза служит важным доказательством их роли в качестве связок (табл. 7).

Таблица 7

Содержание десмозинов в эластине аорты куриного эмбриона и курицы в онтогенезе (число остатков/1000 остатков)

Десмозины	Возраст				
	10 дней	12 дней	15 дней	17 дней	6 недель
Изодесмозин	0,52	0,62	0,74	0,82	1,2
Десмозин	0,55	0,50	0,60	0,72	1,2
Лизин	0,24	0,32	0,36	0.42	0,50

Поперечное связывание обеспечивается лизилоксидазой - медьзависимым и чувствительным к действию латирогенов ферментом, окисляющим ε-аминогруппы избранных остатков лизина с возникновением высокореактивных альдегидов. С участием лизилоксидазы образуются характерные для эластина полифункциональные поперечные связи - десмозины. При дефиците меди в диете, из эластических тканей животных легко экстрагируется тропоэластин.

Катаболические процессы, как известно, обеспечивают разрушение и удаление зрелого эластина и, тем самым, уравновешивают процессы биосинтеза.

Эластические волокна, образовавшиеся в ходе биосинтеза из тропоэластина, являются весьма стабильными структурами и не подвергаются воздействию большинства тканевых протеаз. Однако мнение о том, что во взрослом организме они метаболически инертны, неверно. Фрагментация и лизис эластических волокон кожи и мембран артерий имеет место при старении, сахарном диабете, атеросклерозе и некоторых других патологических состояниях, вызывающих воспалительные изменения в эластинсодержащих тканях (368, 378, 385). Это происходит под влиянием выделяемых полиморфноядерными лейкоцитами и макрофагами эластолитических ферментов.

Известно, что в старости процесс прогрессирующего образования поперечных связей в эластине прекращается; они могут даже разрушаться под действие окислительных агентов (378). Кроме того, вследствие отложения липидов и солей кальция, эластин в большей степени подвергается разрушающему действию эластолитических ферментов, а также становится менее эластичным.

В конечном итоге это приводит к нарушению биомеханических свойств эластинсодержащих тканей (342, 343, 380).

Завершая обзор литературы по вопросам структурных особенностей и свойств эластина, следует подчеркнуть, что выделить этот белок из содержащих его тканей возможно только постадийно: вначале удалив сопутствующие ему биополимеры, т.е. разрушив межволоконные и межфибриллярные связи, а затем нарушив связи микрофибриллами и, частично, внутри них для получения отдельных макромолекул или их ассоциатов.

1.3 *Кератин*

Наряду с коллагеном и эластином кератин является типичным представителем класса волокнистых белков. Он содержится в тканях эпидермального происхождения, к которым относятся шерсть, волос, а также рога, когти, перья, копыта, китовый ус и др. Все перечисленные выше ткани представляют собой сложные многокомпонентные биологические образования, состоящие из отдельных клеток, формирующих их различные гистоструктурные элементы (351).

Большой вклад в знания по структуре кератинов внесли исследования шерсти, а также волос человека (87, 217, 250, 287, 289, 333, 421). Так, к настоящему времени в шерсти обнаружено уже более 20 белков кератиновой природы, изучен их химический состав (222, 228, 229,251).

Отдельные морфологические компоненты шерстного волокна и волоса образованы белковыми веществами, относящимися к группе твердых или мягких кератинов. Содержание этих протеинов составляет более 85% по массе. Твердые кератины отличаются повышенной химической устойчивостью, высоким содержанием серы, значительной термоустойчивостью и тенденцией к образованию ориентированных упорядоченных структур (263, 338). Мягкие кератины характеризуются пониженной устойчивостью к химическим и термическим воздействиям, крайне низким содержанием серы, слабой структурированностью (251). В стержне волоса твердые кератины образуют основные его морфологические компоненты - корковый и чешуйчатый слои. Сердцевина образо-

РОССИЙСКАЯ ГОСУДАРСТВЕННАЯ БИБЛИОТЕКА

вана мягкими кератинами.

Кератины, как уже отмечалось, относятся к фибриллярным белкам. Аминокислотный состав различных кератинов не постоянен и значительно варьирует. Различия в аминокислотном составе кератинов волос разных млекопитающих обусловлены, главным образом, особенностями процесса ороговения эпителиальных тканей в организме (274, 279). В ряде случаев это связано с образованием различных по своему морфологическому составу типов волос (277, 302, 351, 376).

Вариабельность аминокислотного состава указывает на то, что кератины представляют собой не индивидуальное химическое вещество, а группу белковых веществ (269, 283, 284, 288, 396). Аминокислотный состав кератина дает представление о строении его основных структурных единиц - молекулярных цепей, а также об активных группах, участвующих в образовании межмолекулярных связей и в значительной степени определяющих свойства кератина и их изменения под влиянием различных реагентов (250, 291, 297, 331).

Наличие в составе кератинов значительного количества остатков дикарбоновых аминокислот (аспарагиновой и глутаминовой) и аминокислот основного характера (лизина, аргинина и гистидина) определяет их амфотерный характер, обусловливающий возможность активного взаимодействия с реагентами основного и кислого характера, а также ионного взаимодействия между отдельными фрагментами структуры кератинов (как внутримолекулярного, так и межмолекулярного). Присутствие в кератинах гидроксил содержащих аминокислот (серина, треонина, тирозина) позволяет им взаимодействовать с веществами, вступающими в реакцию по месту расположения гидроксильных групп, а также способствует образованию в структуре кератинов интенсивно развитой системы водородных связей, оказывающей существенное влияние на физико-механические, физико-химические и другие свойства волоса (215, 254, 276) .

Наличие в кератинах аминокислотных остатков, содержащих ароматические гетероциклические радикалы (тирозин, триптофан и гистидин) влияет на процессы пигментообразования в волосе, позволяет окрашивать его путем не-

посредственного диазотирования и последующего азосочетания, а также дает возможность осуществления целого ряда реакций, в которых могут принимать участие такого рода радикалы (87).

Огромное влияние на особенности структуры кератинов и проявление ими определенных физико-химических особенностей оказывает в них серосодержащей аминокислоты цистина. Немаловажная роль в формировании структуры кератина принадлежит также аминокислотным остаткам с углеводородной боковой цепью - глицину и пролину (331, 333, 340).

Известно, что остатки аминокислот в белках соединяются друг с другом посредством пептидной связи, образуя так называемое полипептидные цепочки, агрегация которых приводит к формированию макромолекулы белка. Исследования продуктов частичного гидролиза кератинов волоса и концевых аминокислотных остатков (400) показали, что кератины образованы полипептидными цепочками, различными по составу и размерам. Эти полипептиды можно разделить на две группы:

1) обладающие более высоким содержанием цистина и имеющие молекулярную массу около 10000;

2) обладающие низким содержанием цистина и имеющие молекулярную массу от 50000 до 80000.

Вышеуказанные полипептиды встречаются в различных морфологических компонентах волоса.

Взаимосвязь полипептидных цепочек в кератинах, обусловливающая их ассоциацию в гигантскую макромолекулу, осуществляется за счет взаимодействия между главными цепями, а также между боковыми цепями посредством разнообразных типов химических связей (216).

Существенное значение в образовании макромолекулярной структуры кератинов имеет интенсивно развитая система водородных связей, которые могут возникать между карбонильными и имидными группами, карбонильными и гидроксильными группами, фенольными гидроксильными и аминогруппами; свободными карбоксильными группами, амидными группами соседних поли-

пептидных цепочек (353).

Между полипептидными цепочками возникают также электровалентные (ионные или, так называемые, солевые) связи, осуществляющие взаимодействие боковых цепочек аминокислот основного (лизина, аргинина) и кислотного характера (аспарагиновой и глутаминовой). Солевые связи, как и водородные, играют существенную роль в образовании макромолекулярной структуры кератинов, а также во взаимодействии друг с другом отдельных макромолекул и даже различных морфологических компонентов волоса (257).

Основным типом ковалентной связи между полипептидными цепочками в макромолекуле кератинов считается дисульфидная связь, образуемая остатками цистина, входящим своими двумя половинками в две различные полипептидные цепочки. Цистин является диамино-дикарбоновой кислотой и может участвовать в образовании четырех различных пептидных связей, образуя две различные полипептидные цепочки, соединенные дисульфидной связью (87, 231, 254). Помимо этого обе аминные и обе карбоксильные группы цистина могут образовать пептидные связи, входящие в одну полипептидную цепочку. При этом цистин будет входить в состав одной цепочки, и дисульфидная группа не будет образовывать поперечную связь между двумя цепочками, а будет представлять собой дополнительную связь в одной цепочке, располагаясь параллельно ее оси. Для кератинов одних морфологических структур волоса характерно преобладание межцепочечных дисульфидных связей, для других - внутрицепочечных. Дисульфидная связь кератинов очень реакционноспособна. В частности, она легко подвергается гидролизу и восстановлению (320).

Помимо дисульфидной связи между боковыми цепочками в макромолекуле кератинов могут существовать такие типы ковалентных связей как простые эфирные, сложноэфирные, имидные, амидопептидные, а также связи типа уреидных (226). Все они могут присутствовать в кератинах, связывая полипептидные цепочки в макромолекуле белка, а также осуществлять связь как между отдельными макромолекулами, а так и между отдельными гистоструктурными компонентами волоса. Определенного внимания заслуживает вопрос о возмож-

ности наличия в кератинах простых и сложных эфирных связей. Подобный тип связей может играть существенную роль в кератинах волоса, так как имеется ряд экспериментальных данных, свидетельствующих, что некоторые его морфологические компоненты содержат мукополисахариды, которые, будучи полифункциональными соединениями, могут связывать две и даже три полипептидные цепи белка (209, 213). Существенное значение имеют также индолилхиноновые поперечные связи, в образовании которых непосредственное участие принимают пигменты волоса - меланины, которые одновременно являются хромогенными группировками, обуславливающими цвет волоса (223).

Макромолекулы кератинов образуются большим количеством разнообразных и громоздких полипептидных цепочек. Основной их особенностью являются ничтожные размеры в поперечном сечении по сравнению с размерами в продольном направлении. Конформация таких длинных цепочек определяется результатом взаимодействия двух конкурирующих сил: с одной стороны, стремящихся придать им неупорядоченную скрученную форму, при которой концевые участки цепочки будут максимально сближены, что будет сопровождаться возрастанием энтропии системы, и с другой стороны, стремящихся стабилизировать форму цепочки за счет взаимодействия между химически активными группами соседних цепочек (273). В кератинах силы, стабилизирующие структуру, достаточно велики, так как для этих белков характерно наличие аминокислотных остатков, имеющих атомные группировки, между которыми осуществляется активное химическое взаимодействие (113, 331).

Использование методов рентгеноструктурного анализа позволило установить (62, 76, 87, 341), что макромолекула кератина может существовать в трех формах: α-, β- и сверхсокращенной, которые, прежде всего, различаются длиной цепи. Считают, что строение главных молекулярных цепей имеет вид α - спирали (). Превращение α - кератина в β - кератин происходит при длительном растягивании волоса в горячей воде или атмосфере пара. Для β - кератина характерна форма с параллельным расположением полипептидных цепей. Сверхсокращенная форма кератина изучена меньше остальных. Полагают, что при

сверхсокращении происходит дезориентация аморфных участков структуры.

Существование различных форм кератина свидетельствует о том, что в структуре его макромолекул имеются прочно фиксированные, упорядоченные фрагменты, обладающие регулярной конформацией полипептидных цепочек, так называемые кристаллические зоны, и неспиральные дезориентированные неупорядоченные участки - аморфные зоны (рис.2).

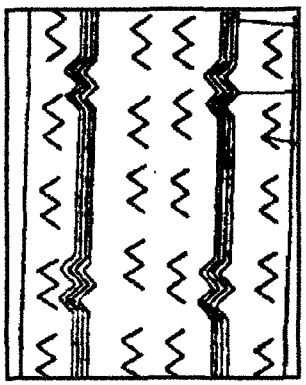


Рис. 2. Двухфазная модель кератина волоса (21).

1- упорядоченная (кристаллическая) фаза фибриллярного вещества; 2 – неупорядоченная (аморфная) фаза фибриллярного вещества; 3 – неупорядоченная аморфная фаза межфибриллярного вещества.

Особый интерес вызывает тот факт, что в кристаллических зонах цистиновые остатки образуют межцепочечные дисульфидные связи, препятствующие развертыванию спиралей при растяжении кристаллических зон. В некристаллических зонах цистиновые остатки образуют внутрицепочечные связи. Поэтому предполагается, что при растяжении волоса деформируются лишь неупорядоченные зоны, а кристаллические, обладающие спиральной конформацией полипептидных цепочек остаются при растягивании неизменными (234,257).

Установлено, что компактная α-спиральная укладка полипептидных цепочек, характерная для кристаллических зон, присуща фрагментам, обладающим небольшим содержанием серы (251, 255, 256, 286, 314, 399). Система из трех α-спиральных цепей, закрученных в общую суперспираль, называется для кератина протофибриллой. Одиннадцать протофибрилл, из которых две находятся в центре, а девять окружают их внешним кольцом, образуют микрофибриллу (рис. 3).

Высокоорганизованное расположение полипетидных цепей, характерное для кератинов с незначительным содержанием серы (цистина), отсутствует у

кератинов с большим содержанием серы (260, 263, 315). Компонент с большим содержанием цистина существует в виде аморфного цементирующего вещества - матрикса, который связывает вместе микрофибриллы (254, 400). Взаимосвязь между микрофибриллами и цементирующим веществом показана на рис. 3, из которого видно, что микрофибриллы расположены пучками, идут параллельно оси (длине) волоса, а цепи с большим содержанием цистина заполняют пространства между микрофибриллами и связывают всю систему. Микрофибриллы и цементирующее вещество группируются вместе, образуя макрофибриллу.

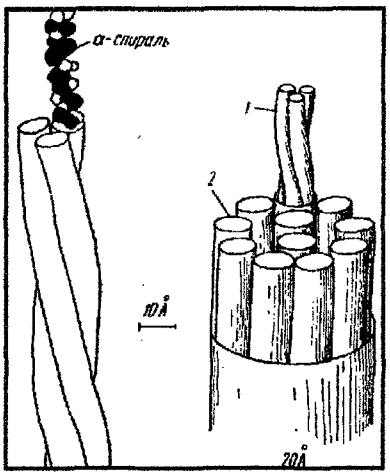


Рис. 3. Строение прото- и микрофибриллы.
1 - трехспиральная суперспираль из трех полипептидных цепей – протофибрилла ;
2 - микрофибрилла, состоящая из 11 протофибрилл.

Согласно современным представлениям (226, 277, 290, 324, 339, 371), биосинтез кератина, происходящий в волосяных фолликулах, является ступенчатым и включает раздельный синтез фибриллярных и аморфных белков. Соединение аминокислот в цепи, скручивание этих цепей в спирали и соединение их в протофибриллы и микрофибриллы происходит в живых клетках. Клетки, лежащие внутри волокна, постепенно приобретают удлиненную форму, а на поверхности становятся более плоскими. Синтез белков волоса в каждой клетке управляется и регулируется ядрами. При формировании (ороговении) волоса клетка умирает и ядро дегенерирует, оставляя небольшое пустое место в каждой клетке. Эти пустоты обычно видны на поперечных срезах сформировавшегося волокна возле центра каждой кортикальной клетки (188, 356, 357). При формировании волоса в поздних стадиях процесса образование фибрилл происходит из цементирующего вещества, являющегося как бы маточным раствором, из которого образуются фибриллы. Из беспорядочно расположенных и пре-

имущественно глобулярных спиралей образуются α-спирали, соединяющиеся различными поперечными связями в усложненные фибриллярные структуры, которые на некоторых участках обладают повторяющейся последовательностью расположения аминокислотных остатков, создающих кристаллические зоны фибрилл (226, 394). В ходе формирования волоса клетки изменяются, теряя до 90 % воды и уменьшаясь до 1/8 первоначального объема, их внутренние структуры, включая ядро, постепенно разрушаются. Процесс завершается формированием в клетках монолитной белковой структуры за счет образования межмолекулярных дисульфидных связей.

Следует особо остановиться на работах, посвященных исследованию химических особенностей кератинов, образующих отдельные морфологические компоненты волоса (188, 228, 229, 421).

Как известно, корковый слой волоса (кортекс) сформирован из ороговевших веретенообразных эпителиальных клеток, ориентированных параллельно длине волокна, покрытых клеточными мембранами и соединенным между собой межклеточными веществом (63,188). Изнутри клетки заполнены плотно упакованными пучками микрофибрилл, погруженных в матрикс, характеризующийся высоким содержанием цистина (356, 357).

По данным (209, 222, 251, 255), кератин фибрилл отличается низким содержанием цистина, пролина и треонина и высоким содержанием аспарагиновой и глутаминовой кислот, лейцина и аланина. Структура фибрилл неоднородна по длине: кристаллические зоны чередуются с аморфными (252, 273). Основой кристаллических зон является α-спираль (399). Из трех цистиновых остатков, входящих в состав двух параллельных расположенных спиралей, два образуют межцепочечные дисульфидные связи, а один - внутрицепочечную. Последовательность аминокислотных остатков в α-спирали такова, что в некоторых участках спирали находятся боковые цепи, содержащие свободные амино-карбоксильные группы, а также гидроксилы, которые могут участвовать в образовании солевых и водородных связей. Поэтому в фибрилле чередуются участки с незначительным развитием поперечных связей (зоны Х) и участки с

большой интенсивностью развития поперечных связей (зоны У) (254, 353).

Цементирующее вещество характеризуется большим содержанием цистина, пролина, треонина, серина и незначительным содержанием лейцина, а особенно аспарагиновой кислоты и лизина (263). Полипептидные спиральные цепи цементирующего вещества не упорядочены, имеют преимущественно глобулярную форму и образуют мало межмолекулярных связей. Цистиновые остатки в цементирующем веществе распределяются, не локализовано как в кератинах фибрилл, а равномерно и образуют преимущественно внутрицепочечные дисульфидные связи. Солевые и водородные связи образуются также в пределах одной цепи, что способствует ее глобулярной конформации. В кератине цементирующего вещества преобладают аминокислотные остатки основного характера, в кератине фибрилл - кислотного. Поэтому между кератинами фибрилл и цементирующего вещества, возможно, иное воздействие и даже образование более прочных связей (254). Кератин микрофибрилл обладает меньшей химической активностью, чем кератин цементирующего вещества. Это объясняется более интенсивным развитием в них поперечных связей.

Химическое взаимодействие в кератинах коркового слоя, в первую очередь, осуществляется в межфибриллярном веществе. В частности, в нем сравнительно легко могут протекать реакции дисульфидно-сульфгидрильного обмена, в результате которых меняются характер дисульфидных связей и образуются новые сульфгидрильные группы. Такая более высокая химическая активность свойственна также, в известной мере, и кератинам, образующим некристаллические неупорядоченные зоны фибриллярных кератинов. Изменение характера спирали в полипептидных цепочках межфибриллярного кератина, ее некоторое ослабление обусловлено присутствием остатка пролина. При растяжении волоса в этом участке может инициироваться реакция сульфидно-сульфгидрильного обмена, приводящая к преобразованию связей, изменению характера конформации полипептидной цепочки и, тем самым, к ослаблению напряжений, возникающих в волосе при его растяжении. Таким образом, межфибриллярное вещество может играть роль пластификатора, обладая способностью ослаблять

напряжение в волосе (276).

Отмеченные выше различия в химическом составе и структуре кератинов фибрилл и межклеточного вещества обуславливают также их на различное отношение к влаге (285). Так, кератины межфибриллярного вещества энергично сорбируют влагу, кератины фибрилл более инертны. В соответствии с этим свойства межфибриллярного вещества, в частности, физико-механические, в значительной степени зависят от его влагосодержания. Свойства фибрилл такой выраженной зависимости не проявляют.

Как отмечалось выше, клетки коркового слоя покрыты мембранами. Данные аминокислотного анализа не указывают на принципиальное отличие кератинов клеточных мембран от межфибриллярных и фибриллярных кератинов (359, 400). В отношении содержания дикарбоновых и гидроксилсодержащих аминокислот кератин клеточных мембран занимает промежуточное положение между кератинами фибриллярного и цементирующего вещества. Что касается цистина и пролина, то содержание их невелико. И хотя это заставляет ожидать наличия в кератинах клеточных мембран спиральной конформации полипептидных цепочек, установлено, что для этих кератинов типична дезориентированная структура α-типа.

По своим свойствам кератины клеточных мембран резко отличаются от фибриллярных и межфибриллярных кератинов. Их высокая химическая устойчивость не может быть обусловлена наличием дисульфидных или водородных межцепочечных связей, т.к. воздействие реагентов, разрушающих эти связи, не вызывает растворения клеточных мембран. В связи с этим ряд исследователей предполагает, что в кератинах клеточных мембран присутствуют поперечные ковалентные связи, не имеющие места в кератинах других структурных компонентов волоса. Это могут быть, например, сложноэфирные или простые эфирные связи, образованные остатками тирозина (275, 283, 338).

Образуя внешнюю оболочку кортикальных клеток, клеточные мембраны играют существенную роль в структурном соединении их в единое целое. Исследование структуры волоса методом электронной микроскопии показало, что

фибриллы не выходят за пределы клетки (63) и, таким образом, не могут являться причиной, обуславливающей взаимное соединение веретенообразных клеток в волокно. Поэтому среди исследователей преобладает мнение о существовании межклеточного вещества, склеивающего кортикальные клетки (213). На поперечном срезе волоса видно, что границы кортикальных клеток отделены друг от друга расстоянием в 25 нм, причем в этом промежутке имеется более плотный центральный слой толщиной около 15 нм, по обе стороны которого расположены два менее плотных слоя, непосредственно соприкасающихся с границами веретенообразных клеток. Совокупность межклеточного вещества и внешней оболочки клеток называют комплексом клеточных мембран (ККМ). Взаимосвязь веретенообразных клеток усиливается за счет того, что концевые участки клеток, имеющие пальцеобразные отростки, как бы внедряются в тело соседней клетки, в результате чего интенсифицируется механическая и химическая связь между клетками (207). При этом внутри клеток, у их границ наблюдается обильное скопление межфибриллярного аморфного вещества. При подобном представлении о тонкой структуре волоса, фибриллярный кератин не может рассматриваться как главный морфологический компонент, определяющий прочное соединение клеток в единое целое и обуславливающий основные свойства волоса.

Вопрос о химической природе межклеточного вещества недостаточно ясен. Оно отличается от кератинов, образующих клеточные структуры волоса, пониженным содержанием серы и азота, а также аминокислот основного характера (аргинина, гистидина и лизина) и повышенным содержанием моноаминокислот (229, 251). Многие данные свидетельствуют о том, что значительная часть межклеточного вещества кератиновых структур образована мукополисахаридами и полисахаридами, которые, за счет способности к полимеризации, взаимодействуют с химически активным межфибриллярным кератином, присутствующим в больших количествах в области комплекса клеточных мембран (213). Прочные кератинуглеводные комплексы образуются с помощью простых и сложных эфирных связей. По всей вероятности, этим можно объяснить их высокую хи-

мическую устойчивость, выражающуюся в нерастворимости в реагентах, разрушающих дисульфидные и водородные связи, а также свойственную им особенность разрушаться протеолитическими ферментами, что ведет к резкому снижению прочности волоса, а иногда - к разрушению его на отдельные клетки (107, 188).

Между клетками коркового и чешуйчатого слоев волоса расположена субкутикулярная мембрана, по многим своим свойствам напоминающая клеточные мембраны. Она обладает значительной механической прочностью, превосходящей прочность коркового слоя, является одним из наиболее химически устойчивых компонентов волоса, ограничивая диффузию ионов и недиссоциированных молекул в толщу коркового слоя (87). В последнее время существование субкутикулярной мембраны как самостоятельного структурного компонента волоса достаточно убедительно отвергается, и она отождествляется с клеточными мембранами и межклеточным веществом (207).

Кутикулярный слой отличается от всего волоса повышенным содержанием цистина, пролина и золы, пониженным содержанием тирозина и аргинина, глутаминовой и аспарагиновой кислот и их амидов, а также наличием липидов (415).

Взаимосвязь кутикулярных клеток, также как кортикальных, осуществляется посредством межклеточного вещества. На внешней поверхности чешуйчатого слоя находится тонкая мембрана толщиной 5-10нм, названная эпикутикулой. Позднее ее наличие было подтверждено методами электронной микроскопии при помощи специального окрашивания (421). Относительно химической природы эпикутикулы пока нет полной ясности (347). Ряд исследователей придерживается точки зрения, что эпикутикула имеет белковую природу, другие считают, что это липидное образование, некоторые полагают, что эпикутикула состоит из полисахаридов. Значительное содержание липидов в чешуйчатом слое обусловлено, по-видимому, эпикутикулой, обильно смачиваемой секретом сальных желез, что определяет повышенную гидрофобность и относительную химическую инертность волоса, не подвергавшегося предварительным обра-

боткам. Данные последних исследований (207, 415) позволяют предположить, что повышенная гидрофобность поверхности волоса обусловлена не только наличием "физического" барьера в виде более плотного поверхностного слоя, а также присутствием веществ жировой природы, но и наличием "химического" барьера, обусловленного особенностями цистиновых фрагментов структуры, которые по своей природе являются гидрофобными. Кроме того, гидрофобность усугубляется ориентацией в поверхностном слое неполярных боковых групп полипептидных цепочек кератина.

Чешуйчатый слой за пределами эпикутикулы не является однородным: в нем различают экзокутикулу, непосредственно примыкающую к эпикутикуле, и следующую за ней эндокутикулу. Сведения о химической природе и особенностях этих структурных компонентов волоса ограничены (341). Известна лишь повышенная чувствительность экзокутикулы к протеолитическим ферментам, что указывает на ее белковую природу. Эндокутикула более устойчива к действию ферментов.

Сведения относительно химической природы и свойств белков, составляющих сердцевину волоса, также весьма ограничены. Известно, что белки сердцевины (мягкие кератины) содержат меньше серы, чем другие морфологические компоненты волоса. Они обладают большей устойчивостью к действию щелочей, и повышенной чувствительностью к ферментам. Для кератинов сердцевины характерны более выраженная амфотерность свойств, повышенная активность к взаимодействию с реагентами как кислотного, так и основного характера, а также способность образовывать внутриструктурные солевые связи (336, 337).

Следует отметить, что подробно описанные выше свойства кератиновых белков, входящих в состав отдельных морфологических компонентов волоса, имеют исключительно важное значение для разработки методов его растворения (167,169, 176, 320, 373, 411) и последующего использования (68, 124, 131, 142, 271, 420).

Завершая обзор литературы, следует подчеркнуть, что, несмотря на значи-

тельные отличия коллагена, эластина и кератина по аминокислотному составу, химическим и физическим свойствам и функциям, эти фибриллярные белки имеют много общего. Это касается, главным образом, их происхождения, активной роли в жизнедеятельности организма и, что особенно важно, закономерностей структурной организации. Общим для них является значительное содержание функционально активных гидрофильных групп –гидроксильных, карбонильных, карбоксильных и др., их расположение, количество, характер и типы связи структурных единиц, относительно большая устойчивость к действию различных химических реагентов.

Общность строения коллагена, эластина и кератина дает возможность не только теоретически обосновать целесообразность создания нового направления в решении проблемы переработки крупнотоннажных белоксодержащих отходов, содержащих эти белки – использование их в ветеринарии, медицине, биотехнологии, косметологии и др. отраслях народного хозяйства, но и практически реализовать его путем разработки способов получения высокоочищенных препаратов солюбилизированных фибриллярных белков и продуктов различных форм и назначений на их основе.

Глава 2. Объекты и методы исследований

Работа выполнялась в период с 1979 г. по 1999 г. и является итогом исследований, выполненных в соответствии с планом научно-исследовательских работ Московской государственной академии ветеринарной медицины и биотехнологии им. К.И.Скрябина по теме "Изучить строение и свойства коллагенсодержащего сырья, модифицированных продуктов и материалов, получаемых на его основе, с целью рационального использования в ветеринарной и медицинской практике, зоотехнии, кожевенно-меховом производстве" (№ гос. регистрации 81045328).

Экспериментальная часть работы была выполнена в лаборатории товароведения и технологии животного сырья МГАВМиБ, а также на базе лабораторий фармакологии, вирусологии, хирургии, физиологии, биотехнологии МГАВМиБ, лаборатории иммунохимии ИЭК ВКНЦ, Научно-учебного центра проблем жизнедеятельности человека РАН, кафедры физики РЭА им. Г.В.Плеханова при участии сотрудников перечисленных выше подразделений.

Поставленные задачи и вопросы решались путем проведения многоплановых исследований:

- по оценке показателей, характеризующих различные виды белоксодержащих отходов как исходное сырье для наработки препаратов фибриллярных белков;
- разработке способов целенаправленного получения из них препаратов коллагена, эластина и кератина и биоматериалов на их основе;
- всесторонней оценке показателей, характеризующих качество и потребительские свойства полученных препаратов.

Объектами исследования служили:

- дерма шкур крупного рогатого скота и свиней (парная и различных сроков хранения);
- сухожилия крупного рогатого скота; краевые участки шкур крупного рогатого скота (лапы, лобаши и др.), получаемые в результате обрядки, конту-

рирования шкур;

- недубленые отходы кожевенного производства - спилок гольевой и обрезь гольевая спилковая шкур крупного рогатого скота и свиней, получаемые в результате двоения шкур, прошедших операцию золения;
- отходы кетгутного производства – подслизистая оболочка тонких кишок овец;
- отходы рыбоперерабатывающего производства – плавательный пузырь осетровых рыб;
- побочные продукты кожевенного производства:
  - волос со шкур крупного рогатого скота (ОСТ 17-289-73);
  - щетина-шпарка (ОСТ 17-181-77);
  - волос северного оленя;
- малоценные побочные продукты мясоперерабатывающего производства - становая жила (выйная связка) крупного рогатого скота (ГОСТ 16147-88);
- малоценные побочные продукты шерстеперерабатывающего производства - мелкий тонкий суровый очес шерсти тонкорунных овец (ОСТ 17-536-83);
- препараты коллагена, эластина и кератина, полученные согласно разработанным технологическим приемам из перечисленных выше отходов и малоценных продуктов;
- препараты и биоматериалы на основе фибриллярных белков, в том числе:
  - инъекционные (Аминакол, Витакол, цитостатики);
  - мази с кровоостанавливающими добавками;
  - пленки с нейропептидами, солями тяжелых металлов, гиалуроновой кислотой;
  - микроносители для культивирования клеток, для аффинной хроматографии;
  - эмульсии косметические, шлихтовальные.

В работе были использованы следующие методы:

- при изучении биологических превращений в дерме шкур крупного рогатого

скота и свиней глубину гидролитического расщепления тканей оценивали:

- по срокам появления продуктов первичного и вторичного распада белков и жиров (34);
- по изменению pH хлор-калиевых вытяжек образцов исходного сырья с признаками автолиза (34);
- оценку бактериальной обсемененности образцов проводили методом гистолого-бактериоскопического контроля (ГОСТ 13106-67); а также с помощью разработанного нами метода редуктазной пробы (53), согласно которому о количестве микроорганизмов можно судить по количеству выделяемой ими редуктазы; при этом учет реакции проводится по степени обесцвечивания слабого органического красителя – резазурина, который будучи акцептором водорода служит не только индикатором наличия, но и активности фермента;
- микробиологические исследования проводили по (26.);

- анализ химического состава исходного сырья, полуфабрикатов и конечных продуктов проводили, применяя традиционные методы химического анализа: содержание белковых веществ определяли по общему азоту методом Кьельдаля, жировых веществ – методом Сокслета, минеральных веществ - в виде золы после сжигания навески (24);
- наряду с известными методами в работе были использованы разработанные или модифицированные нами применительно к изучаемым объектами методики:
  - определение общего азота спектрофотометрическим методом с использованием реактива Несслера, основанным на цветной реакции аммиака с реактивом Несслера, дающим в щелочной среде желтое окрашивание.

Оптимальное время минерализации образцов – не менее 4 часов после начала сжигания. Соотношение объемов разбавленного минерализата и реактива Несслера должно быть, соответственно, 20:1. Целесообразность применения колориметрического метода подтверждается данными, представленными в табл.8.

Таблица 8

Сравнительная оценка содержания белковых веществ в образцах гольевого спилка шкур крупного рогатого скота с помощью предлагаемого метода и метода Къельдаля (n=10)

Метод определения	Содержание белковых веществ, % ($\overline{X}$)	Среднее квадратическое отклонение, s_x	Коэффициент вариации, % V	Ошибка средней, $s_{\bar{x}}$	Критерий достоверности Стьюдента (t) при уровне вероятности $P \geq 0,95$ и 9 степенях свободы	Доверительный интервал при уровне вероятности $P \geq 0,95$ и 9 степенях свободы	Показатель точности определения средней, % (C_s)	Расчетный критерий достоверности при сравнении 2-х методов	Достоверность разницы средних показателей
по Къельдалю	93,18	1,61	1,73	0,51	2,26	93.18±1,17	1,26	1,83	разница недостоверна
колориметрический	94,56	1,21	1.28	0,40	2,26	94,56±0,92	0,97		

- ввиду того, что показатели химического состава, определяемые с помощью традиционно используемых методов, не позволяли в полной мере оценить качество исходного сырья, полуфабриката и готового продукта, была предпринята попытка охарактеризовать исходные образцы путем количественного анализа их тотальных гидролизатов на наличие мономеров (аминокислот, сахаров), специфичных для определенных классов соединительнотканных биополимеров. Поэтому помимо общего белка в образцах исходного сырья, полуфабриката и конечного продукта определяли:
  - содержание коллагена по оксипролину (67);
  - неколлагеновых белков по тирозину (158);
  - углеводных компонентов, входящих в состав белково-углеводных комплексов – гексоз, гексозаминов, уроновых кислот (55).

Следует отметить, что в ходе комплексного биохимического анализа, используемого для контроля и оценки изменений, происходящих с сырьем при первичной обработке, хранении и переработке возникает настоятельная необходимость в оптимизации этого процесса.

Из-за неустойчивости некоторых мономерных компонентов, входящих в состав биополимеров дермы, к действию кислот и высоких температур были проведены модельные эксперименты по отработке оптимальных температурно-временных режимов различных вариантов гидролиза исследуемых образцов. Оказалось, что полная деструкция образцов исходного сырья, промежуточного и конечного продуктов и максимальное освобождение оксипролина в течение 18-часового гидролиза в 6 н. соляной кислоте. Увеличение продолжительности гидролиза до 24 ч не ведет к статистически достоверному увеличению выхода оксипролина.

Максимальное количество тирозина в гидролизатах исследованных образцов можно обнаружить после 12-часового гидролиза в 6 н. соляной кислоте. Дальнейшее увеличение времени гидролиза снижает концентрацию тирозина в гидролизатах, что свидетельствует о его частичном разрушении.

При определении содержания гексоз в исследуемых образцах было уста-

новлено, что специфичность их выявления может быть достигнута только после 24-часового гидролиза в 1 н. соляной кислоте. Оптимальным вариантом для освобождения гексозаминов можно считать 12-часовой гидролиз образцов в 4 н. соляной кислоте (135).

На основании статистической обработки большого количества экспериментальных данных с помощью ЭВМ по специально разработанной программе ALLTAN были получены уравнения, отражающие и воспроизводящие взаимосвязь между анализируемыми параметрами: концентрацией мономера, специфичного для определенного класса соединительнотканных биополимеров (X), и оптической плотностью содержащего его гидролизата (У). Реализация в программе метода наименьших квадратов дала возможность с помощью соответствующих математических преобразований привести вычисленные градуированные зависимости к уравнениям прямой линии и получить выровненные теоретические линии регрессии.

В табл.9 представлены уравнения, отражающие форму статистической связи между концентрацией и оптической плотностью определенного мономера, так и обратную зависимость.

Таблица 9

Уравнения прямой и обратной связи между значениями концентрации и оптической плотности мономеров

Мономеры	Вид функциональной зависимости	
	y=f(x)	x=f(y)
Оксипролин	y=0,0251+0,00901x	x=(y-0,0251)/0,00901
Тирозин	y=0,0762+0,0155x	x=(y-0,0762)/0,0155
Гексозы	y=0,00284+0,00906x	x=(y-0,00284)/0,00906
Гексозамины	y=0,0142+0,000862x	x=(y-0,0142)/0,000862
Уроновые кислоты	y=0,0398+0,0797x	x=(y-0,0398)/0,0797

С помощью приведенных выше уравнений были определены концентрации отдельных полимеров в гидролизатах различных видов сырья, полуфабрикатов

и конечных продуктов и рассчитано содержание соответствующих им биополимеров (146).

Применение приведенных выше уравнений освобождает от необходимости использования дорогостоящих реактивов для построения калибровочных графиков, значительно сокращает и упрощает отработку полученных результатов.

- в ходе исследований был разработан спектрофотометрический способ определения содержания жировых веществ в анализируемых образцах и отработаны оптимальные условия проведения анализа. С этой целью был приготовлен стандартный раствор жира в дихлорэтане с концентрацией 100 мг/мл. Из основного раствора путем разведения готовили растворы с концентрацией жира от 5 до 90 мг/мл. Для выбора красителя, наиболее специфичного, взаимодействующего с липидами, были использованы 0,1 % раствор толуидинового голубого и 0,01 % раствор судана III.

При добавлении одного и того же объема красителей к растворам, содержащим разные количества жировых веществ возникало соответственно голубовато-зеленое или оранжевое окрашивание различной интенсивности при использовании, соответственно, толуидинового голубого или судана III.

Далее проводят измерения оптической плотности окрашенных жиросодержащих растворов в видимой части спектра в диапазоне волн от 400 до 600 нм с интервалом в 50 нм, чтобы выявить максимумы на спектрах поглощения (рис.4, рис. 5).

Полученные данные позволили выбрать длины волн для проведения последующих определений. Для судана III это 400 нм, для толуидинового голубого четкой закономерности не выявлено.

В связи с тем, что предлагаемый метод состоит из двух стадий: экстрагирования жира из исследуемого образца и проведения колориметрической реакции с последующим спектрофотометрированием, необходимо было подобрать условия, позволяющие наиболее полно провести экстрагирование жира из навески. Было проанализировано 2 варианта экстрагирования. Первый заключался в

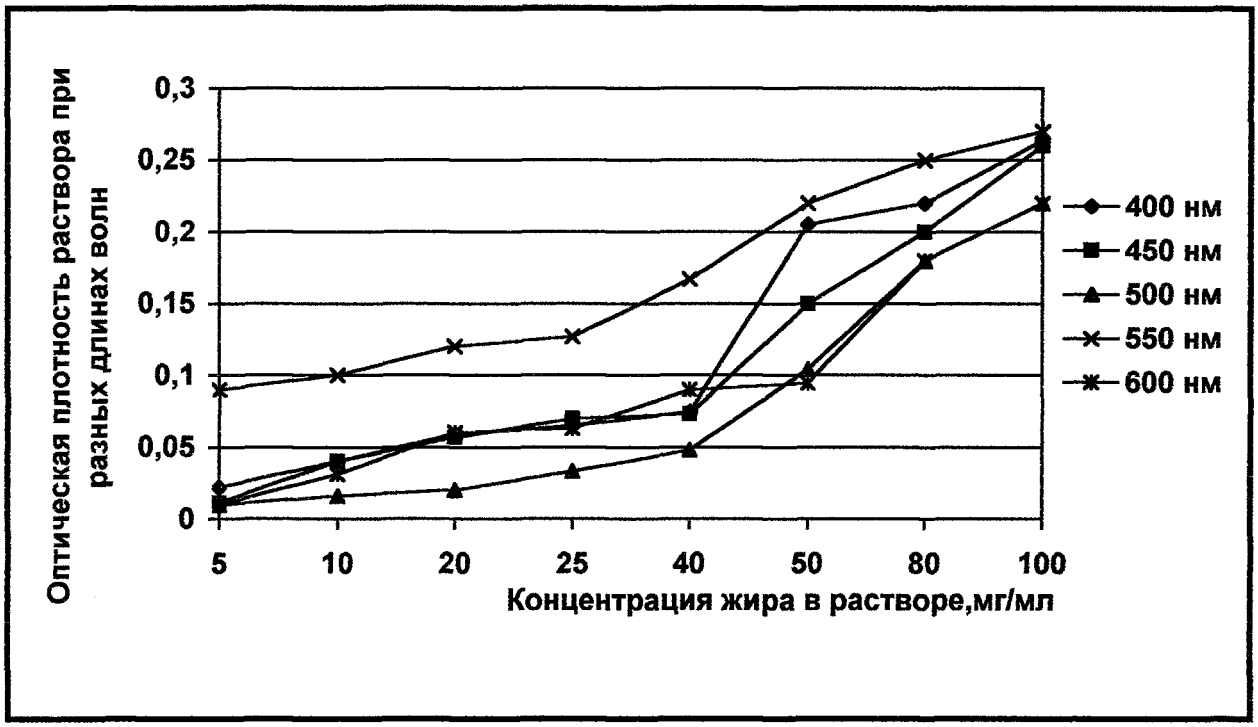


Рис.4. Зависимость оптической плотности раствора от концентрации жира при использовании толуидинового голубого

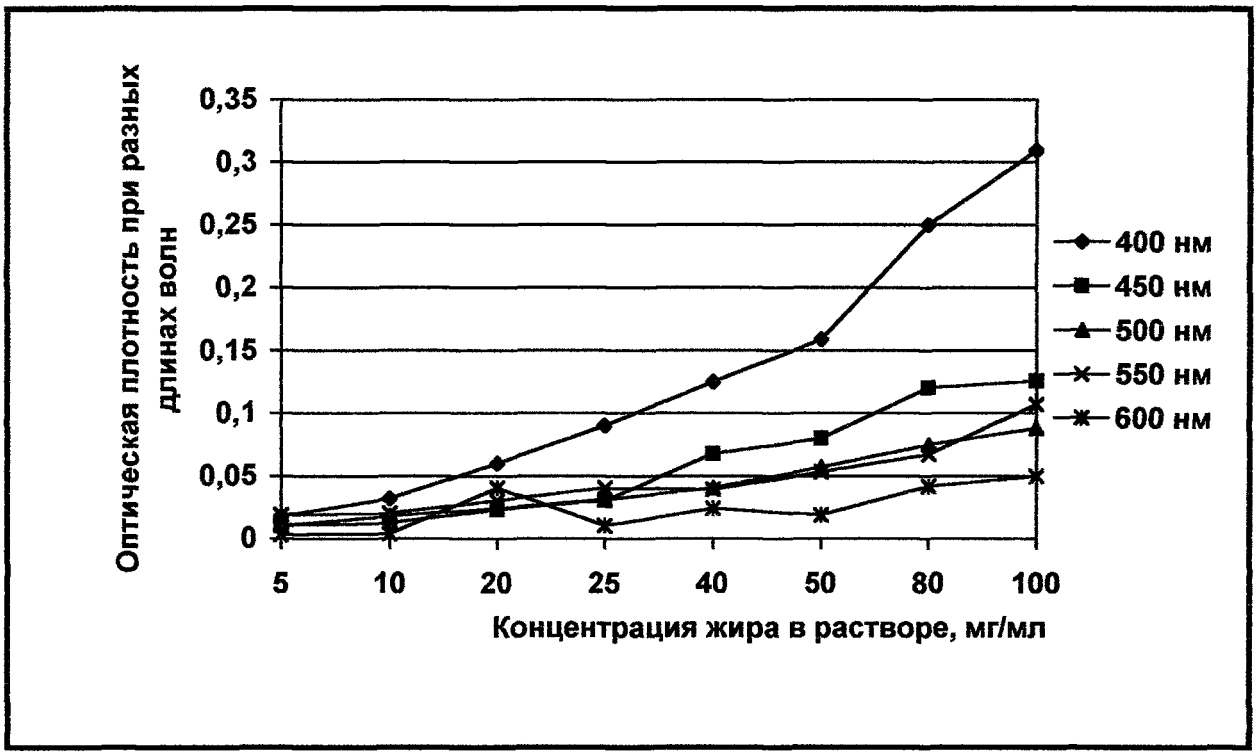


Рис.5. Зависимость оптической плотности от концентрации жира в растворе при использовании судана III

том, что навеску заливали дихлорэтаном и растирали в гомогенизаторе Поттера в течение 10 мин. при 1000-1200 оборотов в минуту. А второй – в экстрагировании жировых веществ в колбе с обратным холодильником на песочной бане (табл. 10).

Таблица 10

Полнота экстрагирования жировых веществ в зависимости от используемого метода

Способ экстрагирования	Содержание несвязанных жировых веществ, % от абсолютно сухого вещества			
	Время, пошедшее на экстрагирование, мин.			
	10	30	45	60
Гомогенизационный	3,0	10,0	16,8	17,0
Экстрагирование на песочной бане	5,0	17,0	17,0	17,0

Как видно из табл. 10, наиболее полное и быстрое экстрагирование жира достигается при кипячении образца в дихлорэтане на песочной бане.

В процессе отработки условий постановки колориметрической реакции было проанализировано качество цветной реакции в зависимости от количества красителя, добавляемого к раствору жира в дихлорэтане. Были проверены различные соотношения красителя и жирового раствора от 1:10 до 1:100 и установлено, сто наиболее отчетливая калориметрическая реакция возникает при соотношении 1:50. Расчет содержания жировых веществ в образцах проводят по формуле:

$$x = \frac{C \cdot V}{M} 100\%, \qquad (1)$$

где: **C** -концентрация жира по калибровочному графику, мг/мл; **V**-объем раствора жира, мл; **M**-масса навески в пересчете на абсолютно сухое вещество, г.

Сравнительная оценка содержания жировых веществ в образцах свиного сырья с помощью предлагаемого метода и метода Сокслета (табл. 11) свидетельствует о хорошей воспроизводимости результатов, высокой точности определения. Недостоверность разницы между средними показателями, полученными при использовании двух методов, свидетельствует о том, что колориметт-

Таблица 11

Сравнительная оценка содержания жировых веществ в образцах свиного сырья с помощью предлагаемого метода и метода Сокслета (n=10)

Метод определения	Содержание жировых веществ, % (средние значения) $\bar{X}$	Среднее квадратическое отклонение, s_x	Коэффициент вариации, % **V**	Ошибка средней, $s_{\bar{x}}$	Критерий достоверности Стьюдента **(t)** при уровне вероятности **P ≥ 0,99** и **9** степенях свободы	Доверительный интервал при уровне вероятности **P ≥ 0,99** и **9** степенях свободы	Показатель точности определения средней, C_s	Расчетный критерий достоверности при сравнении 2-х методов	Достоверность разницы средних показателей
Сокслета	17,2	0,34	1,98	0,11	3,25	17,2±0,36	2,11	0,5	разница не достоверна
колориметрический	17,05	0.17	0,99	0,05	3,25	17,05±0,16	0,94		

рический метод может быть использован наряду со стандартными методами определения жировых веществ.

- биохимический анализ отдельных показателей крови проводили по (64);
- физико-механические характеристики анализируемых образцов определяли по таким показателям как: предел прочности, относительное удлинение, разрушающее напряжение при растяжении, модуль упругости, пористость и др. (24);
- структурные изменения в коллаген-, эластин- и кератинсодержащих тканях оценивали методом термодеформации, который основан на способности биополимеров под действием тепла изменять линейные и объемные размеры, агрегатные и фазовые состояния, а также механические свойства (80, 81, 82, 130).

Изучение энергетических условий, при которых происходят обратимые и необратимые термические изменения линейных размеров белка и определение термодеформационных характеристик исследуемых образцов: коэффициента линейного сваривания, работы деформации образца при нагревании позволяет также рассчитать энергию и число связей в исследуемых образцах.

Основными частями установки, позволяющей производить автоматическую запись тепловой деформации образцов в широком интервале температур являются:

- прибор, с помощью которого в анализируемом образце вызывают термодеформационные изменения, одновременно подвергая его растяжению за счет приложения внешней силы и нагреванию с постоянным повышением температуры среды в широком интервале ее значений;
- автоматический потенциометр КСП-4, на входы которого поступают электрические сигналы от датчиков деформации и температуры. Самописец фиксирует эти сигналы на прямоугольных диаграммах. Совмещение этих записей во времени позволяет построить график зависимости деформации образца от температуры, рассчитать работу тепловой деформации, энергию перехода исследуемого материала в вязко-текучее состояние, количество

связей.

Для преобразования механической деформации образца в электрический сигнал подвижная ось прибора соосно соединена с проволочным потенциометром, угол поворота которого пропорционален деформации образца. Схема установки представлена на рис. 6.

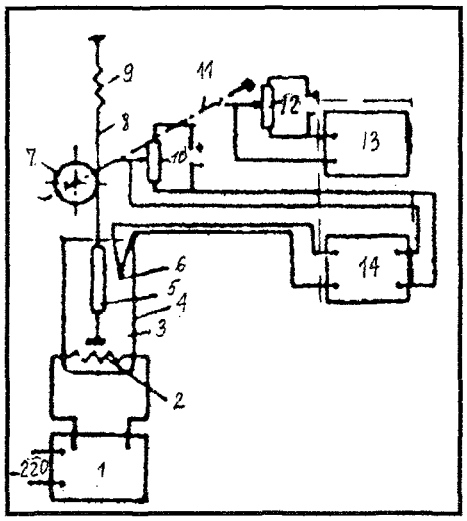


Рис.6. Схема установки для получения временных диаграмм деформаций

Подвижный ролик 7, ось II которого соединена с ползунком потенциометра 10 ПТП-I, поворачивается под действием деформирующих усилий, возникающих при деформациях исследуемого образца 5. Термодеформации передаются на подвижной ролик с помощью нити 8. Концы нити закреплены - один жестко, другой через упругий элемент 9. Исследуемый образец помещается в сосуд 3 с жидкой средой, подогреваемый элементом 2.

Регулировка нагрева среды производится с помощью автотрансформатора I. Температура нагрева фиксируется термопарой 6, электрический сигнал от которой подается на вход самописца 14. На его вход подается также сигнал от потенциометра 10, величина которого пропорциональна термодеформации исследуемого образца. Наличие упругого элемента 9, вместо постоянной силы в виде груза массой 3г, использующейся в традиционных измерениях при определении температуры сваривания, позволяет создать нагрузку, пропорциональную теп-

ловой деформации образца в пределах действия законов Гука. Тем самым возможно получение информации не только при сжатии волокон в момент нарушения связей при сваривании, но и при деформации растяжения, испытываемой образцом при нагревании.

Установка позволяет решать следующие задачи:

– определять коэффициенты линейного теплового расширения образца;

– определять их температуру сваривания;

– определять работу деформации образца при нагревании;

– определять энергию и число связей в образце.

Работа деформации пружины, равная работе тепловой деформации образца, может быть представлена как:

$$A = \int_{x_2}^{x_1} KI_1 dx - \int_{x_2}^{x_1} Kxdx \quad (2)$$

или

$$A = \frac{KI_1 x}{\Delta t}(t_1 - t_2) - \frac{Kx^2}{\Delta t}(t_2 - t_1) \quad (3),$$

где **К**-коэффициент жесткости пружины, н/м; Δ**Т**-температурный интервал считывания; t_1 t_2 –температурные пределы термодеформации, х-деформация удлинения, м; l_1- длина напряженной пружины, м.

Увеличивая температурный диапазон можно производить не только расчет работы теплового расширения образца при $T<T_{нгс}$ (температуры начала гидротермического сокращения), но и работы теплового сжатия при $T>T_{нгс}$, когда в результате постадийного разрушения межмолекулярных поперечных связей различной природы происходит контракция белоксодержащего материала.

В случае использования в качестве нагрузки постоянной массы, т.е. F=mg., то выражение (2) преобразуется к виду:

$$A = \int_{x_2}^{x_1} mgdx = \frac{mg\Delta l}{\Delta t}(t_2 - t_1) \quad (4)$$

здесь: **m**-масса груза (кг); **g** = 9,8 м/с^2; **Δl**-удлинение образца при нагревании; l_0-начальная длина образца, м; х-деформация удлинения, м; **Δt**-интервал считыва-

ния по температурной шкале; t_1, t_2-температурные пределы термодеформации.

На основе вышеприведенного алгоритма расчетов на кафедре физики академии им. Плеханова создана компьютерная программа для удобства обработки первичных результатов;

- определение концентрации и размеров коллоидных частиц в дисперсиях фибриллярных белков осуществляли методом поточной ультрамикроскопии, который основан на использовании способности коллоидных частиц, размеры которых много меньше длины световой волны, рассеивать свет в соответствии с законами дифракции (78, 79).

В связи с тем, что размеры коллоидных частиц находятся за пределами разрешающей способности обычных микроскопов. Для наблюдения за ними используются ультрамикроскопы различных модификаций.

С этой целью наблюдение частиц ведется перпендикулярно световому потоку их освещающему. В этих условиях в окуляре каждая частица видна на темном фоне в виде светящейся точки, а яркость точки может быть источником информации о ее размерах. При этом частичная концентрация $N_ч$ может быть легко и удобно подсчитана оператором по количеству "вспышек" **n**, объему, протекающей жидкости **V**, содержащей гидрозоль. Величина $N_ч$ также зависит от наблюдаемого в микроскопе объема, который вырезается диафрагмой из всей освещаемой в кювете зоны гидрозоля. Формула для вычисления частичной концентрации $N_ч$ имеет следующий вид:

$$N = \frac{a \cdot n}{V} \quad (5)$$

Коэффициент **a** зависит от отношения площадей, освещенного объема в кювете поточного ультрамикроскопа и площади, вырезаемой диафрагмой. Величина коэффициента устанавливается экспериментально для каждой диафрагмы.

В нашем случае $a = 3 \times 10$, $V = 0{,}066$ см^3.

Далее вычисляли общую концентрацию частиц $N_{общ}$ в единице объема с учетом разведения исследуемого образца (в):

$$N_{общ} = N_ч \times в \quad (6)$$

В связи с тем, что весовая концентрация **C**, плотность дисперсной фазы **g**, общее количество частиц $N_{общ}$ и средний объем частиц **V** связаны определенной зависимостью: **C = VgN**, можно найти средний объем частиц **V** как:

$$V = \frac{C}{g \cdot N} \quad (7)$$

тогда радиус легко найти из уравнения:

$$r = \frac{3V}{4\pi} = \frac{3C}{4\pi N_{общ}} \quad (8)$$

Главным недостатком такого метода определения размера частиц является невозможность определения размера частиц каждой весовой фракции, входящей в состав коллоидной системы; кроме того, чтобы получить достоверные результаты, необходимо очень большое количество отдельных наблюдений.

В ходе постоянного усовершенствования методики и аппаратуры поточной ультрамикроскопии на базе схемы поточного ультрамикроскопа Дерягина-Власенко на кафедре физики РЭА им. Г. В. Плеханова было создано устройство, позволяющее определить непосредственно численную концентрацию и размер частиц в субмикронной области с учетом их фракционного состава.

Применение монохроматического когерентного источника света и поляризационного анализатора в поточном ультрамикроскопе (рис.7) позволяет осуществить быстрое определение наиболее вероятных размеров коллоидных частиц и построить кривую распределения частиц по новому методу, в основу которого положена формула, объединяющая законы Релея и Малюса.

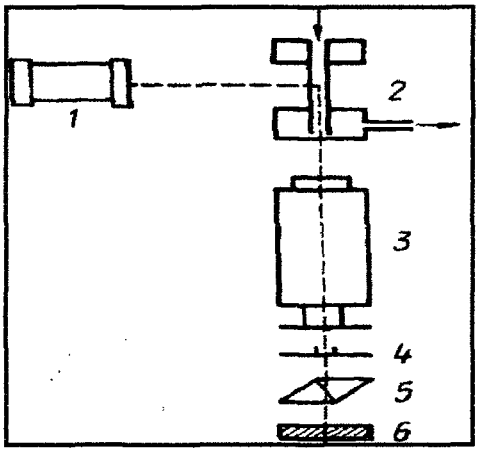


Рис.7. Схема поточного субмикронного ультрамикроскопа.

Устройство состоит из лазера типа ЛГ-105 (1), проточной измерительной кюветы (2), микроскопа (3), диафрагмы (4), поляризационного анализатора ПА (5), фотоприемника (7) и регистрирующего устройства (6). Чтобы сократить до минимума рассеяние света, свет от лазера направляется непосредственно на капилляр, конфигурация которого позволяет резко ослабить рассеяние света на станках кювета и обеспечить тем самым регистрацию более мелких частиц.

В микроскоп вмонтирован поляризационный анализатор, ось вращения которого совпадает с оптической осью микроскопа. Диск, на котором смонтирован поляризационный анализатор, может вращаться как по часовой, так и против часовой стрелки. Угол поворота отсчитывают по шкале в градусах.

Так как свет, падающий в микроскоп, от каждой частицы поляризован, то при совпадении плоскости колебания света и главной плоскости поляризации анализатора (т.е. угол между этими плоскостями равен 0), интенсивность света, рассеянного частицами, максимальна. При увеличении этого угла путем вращения диска анализатора эта интенсивность регистрируемой “вспышки” уменьшается и при $\alpha = 90°$ теоретически равна 0, то есть рассеянный свет от частицы наблюдаться не будет.

Согласно уравнению Релея, интенсивность света, рассеянного одной частицей будет равна:

$$Ip = ABVIo, \quad (8)$$

где I_o - интенсивность падающего света;

I_p - интенсивность рассеянного света;

V - объем отдельной частицы;

A и **B** - постоянные, зависящие, соответственно от оптических свойств дисперсной фазы и дисперсионной фазы, и от интенсивности падающего света, и длины волны.

При некотором значении угла поворота $\alpha_{кр}$ интенсивность рассеянного света, прошедшего через анализатор, в соответствии с законом Малюса, становится минимальной и пороговой и уже не воспринимается глазом или регистри-

рующим устройством:

$$I'_{пор} = I_0 \cos \alpha_{кр} \quad (9)$$

В этой формуле I_0 - интенсивность света, рассеянного одной частицей.

Поскольку в формулах (7) и (8) полученные величины интенсивности света относятся к одной частице, то значения I'_p и I_0 могут быть приравнены друг к другу, то есть $I'_p = I_0$. В соответствии с этим, объединяя законы Малюса и Релея, для рассматриваемого случая можно записать следующее:

$$I'_{пор} = ABV \cos \alpha_{кр} \quad (10)$$

Для монодисперсной коллоидной системы с заведомо известным объемом частицы V_0 имеем:

$$I'_{пор} = ABV_0 \cos \alpha_0, \quad (11)$$

где α_0 - угол гашения света от частиц коллоидной системы, принятой за эталон.

Приравнивая правые части уравнения и считая, что коэффициенты А эталонной и исследуемой системы равны, получим:

$$V_0 \cos \alpha_0 = V \cos \alpha_{кр} \quad (12)$$

Откуда формула для определения объема коллоидной частицы с учетом, что $V_n = V$, запишем так:

$$Vr = Vo \frac{\cos \alpha_o}{\cos \alpha_{кр}} \quad (13)$$

Для определения радиуса частиц коллоидных растворов, отличающихся от эталонной своими оптическими свойствами, в выражении (13) вводится коэффициент **k**, учитывающий различные показатели преломления эталонного коллоидного раствора и исследуемой системы. Выражение для вычисления радиуса частиц в этом случае принимает следующий вид:

$$R_n = Kr_o \frac{\cos \alpha_o}{\cos \alpha_{кр}}, \quad (14)$$

Таким образом, поляризационный анализатор, установленный в поточном ультрамикроскопе при наличии поляризованного монохроматического света, выполняет функцию системы фильтров, подобно тому, как с помощью системы

СИ с разным размером ячеек, можно сортировать порошок. В рассмотренном случае изменение размеров ячеек осуществляется путем изменения угла поляризационного анализатора.

Число частиц, подсчитанное при угле поворота $\alpha = 0°$, соответствует максимальному количеству частиц в коллоидной системе, когда присутствуют частицы всех размеров. При увеличении угла поворота α происходит постепенное "выбывание" некоторых частиц и их число постепенно уменьшается.

Подсчитывая концентрацию частиц при изменении угла поворота α в пределах **0** и построив полученную зависимость, получают интегральную кривую $N = f(\alpha)$. Зависимость носит название гистограммы, так как изменение величины α достаточно велико. При уменьшении величины α и стремлении ее к **0** получают дифференциальную кривую.

Величина угла поворота поляризационного анализатора и размер частиц взаимосвязаны, поэтому возможен пересчет величины в диаметр или радиус частиц. Кривая $N=f(r)$ или $N=f(d)$, где **d** и **r** - радиус и диаметр частиц соответственно, носит название кривой распределения частиц по размеру.

На основе вышеприведенного алгоритма расчетов на кафедре физики академии им. Г. В. Плеханова совместно с кафедрой товароведения и технологии животного сырья МГАВМиБ нами создана компьютерная программа для удобства обработки первичных данных.

- Анализ химической чистоты полученных препаратов коллагена проводили методом диск-электрофореза в полиакриламидном геле (119,145).

Для фракционирования продуктов растворения коллагена (ПРК) использовали разработанную модификацию диск-электрофореза в кислой среде.

Электрофорез проводили в камере блочного типа. В качестве электродного буфера применяли 10 %-ный водный раствор глицин-ацетатного буфера pH 4,0. Разделяющий гель (3,5 %-ный раствор акриламида на калий-ацетатном буфере pH 2,9) готовили перед опытом, затем заливали его в камеру после предварительного дегазирования в вакууме. На поверхность раствора геля осторожно наслаивали с помощью шприца воду для предотвращения образования мениска.

Полимеризация геля проходила в течение 1-1,5 ч.

Образцы ПРК перед диск-электрофорезом диализовали в специальных диализных трубочках фирмы «Sigma» против электродного буфера pH 4,0 в течение 3 сут. при температуре +4 °С на магнитной мешалке.

По окончании диализа в ПРК добавляли сухую сахарозу (300 мг/мл) и биогель P=200 для повышения плотности исследуемого образца, а также краситель метилиленовый синий для маркировки движущегося пограничного слоя во время электрофореза. Полученную смесь подслаивали под электродный буфер непосредственно на разделяющий гель.

Во избежание нагревания геля все опыты по фракционированию ПРК проводили при +4°С, используя охлажденные буферные растворы. Режим электрофореза следующий: сила тока - 100 мА, начальное напряжение - 400В, конечное - 180 В. Опыт заканчивали через час после того, как краситель выходил из гелевого пласта в нижнюю электродную кювету. По окончании электрофореза пласт геля извлекали из камеры и помещали на 30 мин. в раствор пикриновой кислоты для фиксации разделенных веществ, затем гель отмывали от фиксатора дистиллированной водой, трижды сменив ее через каждые 10 мин. Окрашивали гель путем инкубирования его 0,5 %-ном растворе Кумасси бриллиантового голубого R-250 в течение часа. Избыток несвязавшегося с белком красителя удаляли, применяя многократную промывку геля жидкости для обесцвечивания (в соотношении этанол : уксусная кислота : вода, 5:1:5, v:v). Количественную обработку электрофореграмм проводили после их денситометрирования на интеграторе (Densitorol) ДМИ-2 фирмы «Toyo» (Япония). Относительную электрофоретическую подвижность отдельных фракций вычисляли как отношение пути, пройденного определенным компонентом, к длине разделяющего геля.

- для характеристики антигенных свойств продуктов растворения коллагена (ПРК) и получаемых из них искусственных фибриллярно-пористых материалов, а также для определения уровня антител к коллагену в сыворотках больных ревматоидным артритом и крупного рогатого скота с признаками коллагенозов, использовали некоторые методы иммунохимического анализа:

- ***антисыворотки*** получали иммунизацией 10 кроликов-самцов породы «шиншила». Применяли схему иммунизации, по которой при первой инъекции ПРК в смеси с полным адъювантом Фрейнда (фирма «Дифко» (США) 1,1, V:V) в объеме 0,2 мл вводили каждому кролику в область подколенных лимфоузлов, а также подкожно в четыре точки на спине животного. Подкожные инъекции повторяли дважды в возрастающих дозах по 0,6 и 1,0 мл с недельным интервалом между введениями. Кроме того, этим же кроликам параллельно вводили ПРК без адъюванта Фрейнда. В процессе грундирования каждому животному было введено 16,8 мг антигена. Активность сыворотки проверяли через 7-9 дней после первого цикла иммунизации. Через месяц после последней инъекции ПРК проводили однократную реиммунизацию, при этом вводили 1,0 мл ПРК без адъюванта внутривенно. Кровь брали на 6-8-й день после реиммунизации. Сыворотку получали по общепринятой методике, разливали в пенициллиновые флаконы и хранили до использования при -70 °С;
- ***антитела к коллагену*** выявляли с помощью диагностической тест-системы на основе реакции энзим-меченых антител (РЭМА) (29,155).

Метод основан на переводе антигенов в нерастворимое состояние путем пассивной адсорбции на твердой фазе, например, на внутренней поверхности полистироловых микрогемагглютинационных плашек. Сыворотку, в которой предполагалось наличие антител, инкубировали в сенсибилизированных емкостях носителя. Избыточные компоненты сыворотки отмывали, а затем добавляли энзим-меченый антииммуноглобулин (конъюгат). Количество конъюгата, зафиксировавшегося на комплексе антиген-антитело на поверхности носителя, после промывания измеряется количеством разрушившегося субстрата и служит мерой количества специфических антител в сыворотке (рис. 8).

В качестве тестируемых параметров, определяющих степень фиксации ПРК на внутренней поверхности полистироловых микрогемагглютинационных плашек, использовали:

- концентрацию антигена (по общему белку) (рис. 9);

– pH комплексирующего буфера (рис. 10);

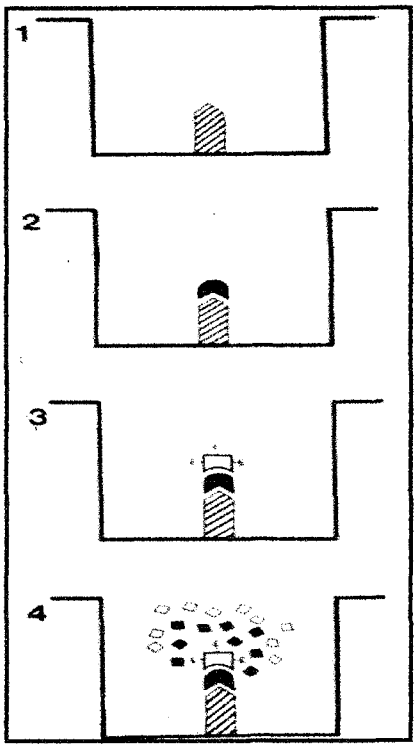
– время и температурный режим фиксации антигена (рис. 11).

Реакцию регистрировали:

а) визуально - записью конечного титра сыворотки, причем реакцию считали положительной при таком разведении сыворотки, когда отчетливо была видна разница в окрашивании субстратной смеси по сравнению с контролем;

б) инструментально - на энзим-метре «Polymak» (Италия) в 1 см проточной микрокювете при λ=450 нм по разнице между показателями экстинкции исследуемой сыворотки на соответствующем антигене (сигнал) и инертном белке – БСА.

Использовали также способ статистической экстраполяции показаний экстинкции «сигнала» и «индивидуального шума» (полученных при различных разведениях исследуемой сыворотки) к цельной не разведенной сыворотке;



1- фиксация антигена на нерастворимой основе (полистироле);

2- добавление сыворотки, содержащей антитела к данному антигену;

3- внесение конъюгата;

4- добавление субстрата.

Рис.8. Схема постановки реакции энзим-меченых антител.

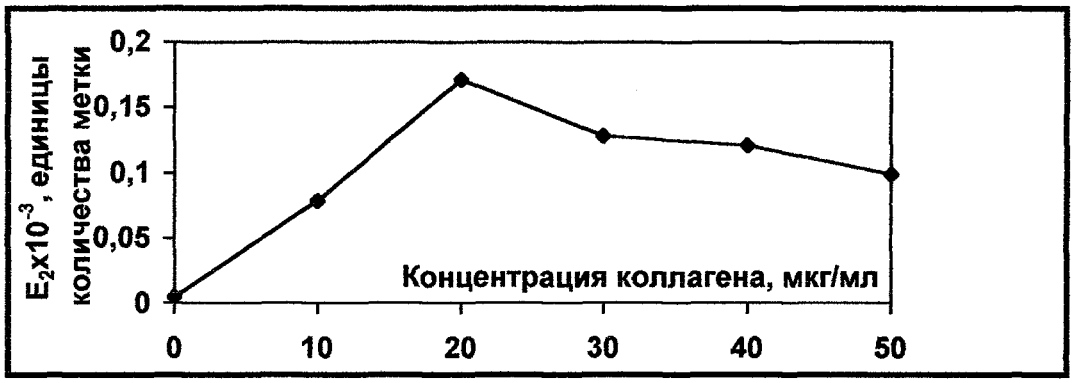


Рис. 9. Подбор оптимальной концентрации антигена

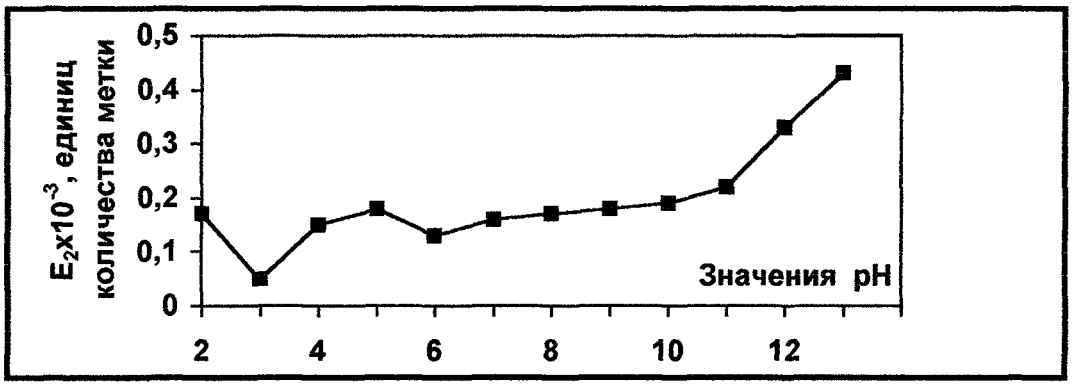


Рис. 10. Подбор pH комплексирующего буфера

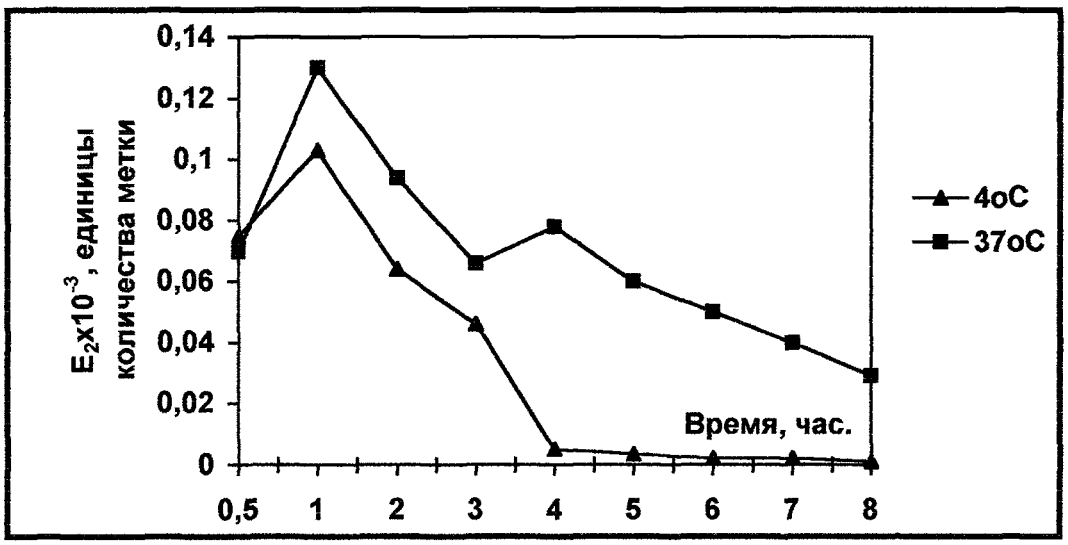


Рис. 11. Подбор времени фиксации коллагена на полистироле

- ***анализ степени антигенности коллагеновых губок.*** **В** работе использовали готовые образцы коллагеновых губок. Губку разрезали на мелкие кусочки и заливали буферными растворами с pH 7,2; 9,6; 13,0 в соотношении 20 мл буферного раствора на 6 гр. губки и выдерживали в течение суток при +4 °С. Для получения экстрактов «кашицы» из губки подвергали обработке на ультразвуковом дезинтеграторе (прибор фирмы MSE), гомогенат осветляли центрифугированием при 8 тыс. об/мин. Надосадочные жидкости (экстракты) использовали в качестве антигенов при иммунизации кроликов и для сенсибилизации плашек при постановки РЭМА с целью выяснения антигенности ИКМ по сравнению с ПРК. Антисыворотки к экстрактам из губок получали по описанной выше схеме. Постановку РЭМА осуществляли по описанной выше схеме;
- ***выявление антител к коллагену в сыворотках больных ревматоидным артритом и животных с признаками коллагеноза*** проводили с помощью разработанной на основе РЭМА диагностической тест-системы, описанной выше. После нагрузки полистирола ПРК из сухожилий крупного рогатого скота в оптимальном режиме (20 мкг/мл, 37 °С, 1 ч.), несвязавшийся антиген удаляли промыванием. Заведомо положительные сыворотки от больных ревматоидным артритом и животных с различным уровнем антител в скрининг-титре 1:200 и сыворотки доноров и здоровых животных в том же титре инкубировали в полистироловых ячейках с зафиксированным антигеном в течение 1 ч. при 37 °С. После отмывки во все лунки вносили конъюгат в разведении 1:400 и выдерживали в термостате и 1ч. при 37 °С. После удаления несвязавшего конъюгата и промывки в плашку добавляли субстрат. Учет реакции проводили визуально и инструментально через 2 часа после внесения субстратной смеси.

Использование современных высокочувствительных методов иммунохимического анализа, модифицированных с учетом антигенных особенностей колла-

гена позволило за сравнительно короткий срок (1,5 месяца) получить гипериммунные сыворотки к ПРК, разработать систему количественного учета специфических антител к коллагену, охарактеризовать ИКМ, полученные из ПРК с точки зрения их антигенности и иммуногенности, а также показать принципиальную возможность применения разработанной тест-системы для диагностики патологического состояния соединительной ткани путем выявления антител к коллагену в сыворотках больных людей и животных;

- токсико-гигиенические испытания препаратов фибриллярных белков проводили в соответствии с (39), (94) и (95);
- аналитическую обработку экспериментальных данных проводили на IBM-совместимом компьютере с помощью пакета программ Microsoft Office 97 Professional.

Глава 3. Характеристика белоксодержащих отходов кожевенного, мясоперерабатывающего и шерстеперерабатывающих производств как возможного сырья для наработки фибриллярных белков

Промышленная переработка животного сырья по традиционным технологиям неизбежно связана с образованием твердых производственных отходов и побочных продуктов, в том числе и белоксодержащих. Например, специфика кожевенной промышленности, получающей сырье от предприятий мясной отрасли, такова, что при выработке готовых кож используется только 29 - 45 % сырья, остальная часть его переходит в отходы на отдельных стадиях технологического процесса.

Объемы и биологическая ценность таких отходов, главными структурными и химическими компонентами которых являются фибриллярные белки - коллаген, эластин и кератин, заслуживают того, чтобы обратить на них более серьезное внимание и использовать с большей эффективностью в соответствии с требованиями времени.

Однако для того, чтобы рекомендовать тот или иной вид недубленых белоксодержащих отходов кожевенной промышленности, а также малоценных и побочных продуктов мясо- и шерстеперерабатывающих производств в качестве сырья для предприятий, занимающихся изготовлением продукции фармацевтического, косметического, биотехнологического и другого назначения, необходима комплексная оценка имеющихся ресурсов по ряду физико-химических и биологических показателей.

3.1. Изучение биологических превращений, происходящих в дерме снятых шкур в процессе хранения

Как известно, животное сырье представляет собой сложную многокомпонентную систему, свойства которой изменяются под действием тканевых ферментов, микроорганизмов и других факторов (40, 43, 48).

Уровень и характер такого рода изменений в исходном сырье, при соблюдении условий и режимов процесса хранения, оказывает большое влияние на качественные характеристики готовой продукции.

Биологические превращения в дерме снятой шкуры, ведущие к денатурационным и агрегационным изменениям ее белковых структур, происходят постепенно, однако при длительных сроках хранения в неблагоприятных условиях, они могут приобретать спонтанный характер (34). На наш взгляд, оценить глубину гидролитического расщепления белков можно, выявляя продукты их распада - пептидные фрагменты или аммиак - в анализируемых образцах, с помощью методов качественного анализа (табл.12).

Таблица 12

Динамика появления и накопления продуктов первичного и вторичного распада белков в дерме шкур крупного рогатого скота (I) и свиней (II)

Время прошедшее с момента снятия шкуры, час.	Внешний вид анализируемого раствора при наличии в нем продуктов распада белковых веществ			
	Первичные в бульоне (на основе реакции пептидных фрагментов с ионами меди в щелочной среде)		Вторичные в водной вытяжке (на основе реакции аммиака и солей аммония с реактивом Несслера)	
	Объект исследования			
	I	II	I	II
4	Прозрачный с единичными мелкими волокнистыми хлопьями	Мутный с крупными единичными хлопьями	Прозрачный зеленовато-желтого цвета	Прозрачный зеленовато-желтого цвета
6	Слабое помутнение, мелкие единичные хлопья	Желеобразный с крупными хлопьями	То же	Слегка мутноватый, зеленовато-желтого цвета
8	Мутный с крупными хлопьями	То же	Слегка мутноватый зеленовато-желтого цвета	То же
12	То же	То же	То же	Мутный желтого цвета
24	То же	То же	Мутный желтого цвета	Мутный, желтого цвета, появляется осадок
36	То же	То же	Мутный желтого цвета, легкий осадок желтого цвета	Мутный с желто-оранжевыми хлопьями

Как видно из таблицы 12, расщепление белков протеолитическими ферментами в свиной дерме начинается уже через 4 часа, в дерме крупного рогатого скота - через 6 часов после снятия шкуры. Интенсивность этого процесса

нарастает в зависимости от срока нахождения сырья в неблагоприятных условиях. Причем, в свиной шкуре динамика накопления продуктов первичного распада белков носит более выраженный характер, чем в дерме крупного рогатого скота.

Аналогичная закономерность наблюдается и в процессе появления вторичных продуктов распада белков. Следует подчеркнуть, что сроки их появления находятся в прямой зависимости от скорости развития послеубойных автолитических процессов, так как именно они создают благоприятную среду для возникновения гнилостных процессов.

В свиной дерме первые следы аммиака удается обнаружить через 12 часов, тогда как в дерме крупного рогатого скота - только через 18-24 часа. Скорее всего, это связано с особенностями строения дермы свиной шкуры (52).

Степень деструкции белковых компонентов дермы под действием микроорганизмов во многом зависит от pH среды (табл. 13).

Таблица 13

Изменение pH хлоркалиевых вытяжек из образцов дермы крупного рогатого скота (I) и свиной (II) в зависимости от сроков их хранения в неконсервированном состоянии

Срок хранения	pH хлоркалиевой вытяжки (средние значения, n=5)	
	Вид сырья	
	I	II
4	6,54	6,54
6	6,91	7,03
8	7,02	7,22
12	7,15	7,49
24	7,35	8,64
36	7,79	8,00

Как видно из табл. 13, с увеличением сроков хранения сырья в неконсервированном состоянии pH хлоркалиевых вытяжек из обоих видов сырья смещается в щелочную область. Однако в образцах свиной дермы значения величин pH на всех контрольных сроках анализа выше, чем в образцах из дермы крупного рогатого скота.

Сравнивая динамику изменения pH с динамикой появления продуктов первичного и вторичного распада белков (табл.13 и 12), следует отметить, что если величина pH меньше или равна 6,5, деятельность тканевых ферментов не про-

является. Увеличение значения этого показателя от 6,7 до 7,15 является отражением автолизных процессов, ведущих к накоплению в ткани первичных продуктов белкового распада. Последующее увеличение pH среды от 7,2 до 8,0 и выше совпадает с процессами накопления вторичных продуктов распада белков.

Наряду с вышеописанными процессами в снятой шкуре не менее активно происходят и окислительные процессы, следствием которых является появление продуктов распада жировых веществ. Содержание влаги, pH среды, температура и др. факторы оказывают большое влияние на распад жиров (46,50, 52). Как и распад белков, этот процесс происходит ступенчато и катализируется вначале тканевыми, а затем микробными липолитическими ферментами.

Первичными продуктами распада жировых веществ являются пероксидные соединения в виде свободных радикалов и присоединенных к ним молекул кислорода. Результаты опытов по определению сроков появления продуктов первичного распада жиров и динамики их накопления (табл. 14) свидетельствуют о том, что их можно обнаружить в дерме крупного рогатого скота и свиней уже через 4 часа после убоя животных. Однако, их количество в этот момент крайне незначительно и, по-видимому, пока не влияет на основные показатели, характеризующие качество сырья.

Таблица 14

Динамика появления и накопления первичных продуктов распада жировых веществ в дерме шкур крупного рогатого скота (I) и свиней (II) (средние значения, n=5)

Время, час.	Содержание жира в хлороформенном экстракте из навески, г.		Коэффициент поправки к пероксидному числу, K_2		Объем 0.01 М раствора тиосульфата натрия, мл.		Пероксидное число, % йода	
	Анализируемый образец							
	I	II	I	II	I	II	I	II
4	0,096	0,643	0,88	0,89	0,3	0,3	0,004	0,006
6	0,088	0,602	0,83	0,84	0,4	0,6	0,0074	0,009
8	0,059	0,588	0,57	0,80	0,6	0,9	0,008	0,01
12	0,051	0,383	0,49	0,52	1,0	1,5	0,012	0,019
24	0,046	0,361	0,44	0,50	1,7	2,0	0,0184	0,025
36	0,04	0,283	0,37	0,39	2,5	2,7	0,024	0,026

Полученные результаты согласуются с имеющимися в литературе (34) значениями пероксидных чисел для поверхностного шпика свинины и покрывного жира говядины, согласно которым пероксидное число меньшее или равное 0,013 % для свинины и 0,018 % для говядины свидетельствует о хорошем качестве мяса, 0,018-0,023 - удовлетворительном, но не подлежащем хранению, 0,023 и выше - о неудовлетворительном.

В связи с тем, что аналогичных данных для животного сырья в доступной литературе обнаружено не было, мы вынуждены были сравнивать собственные результаты с величинами, характеризующими значение данного показателя для мяса. Так, через 12 часов после снятия свиной шкуры количество первичных продуктов распада жиров в исследуемых образцах соответствует значению пероксидного числа, характеризующему начало окислительной порчи жира (0,019 %).

Для образцов дермы крупного рогатого скота подобное состояние наступает через 24 часа (0,0184 %). Через 24 часа значение пероксидного показателя для свиного сырья возрастает до 0,025 %, через 36 часов оно становится равным 0,026 %. В дерме крупного рогатого скота аналогичное количество пероксидных соединений (0,024 %) можно обнаружить только после 36-часового хранения без консервирования.

Повышенное содержание первичных продуктов становится причиной накопления свободных жирных кислот, представляющих собой вторичные продукты распада жировых веществ (190).

Оценка глубины гидролитического расщепления жиров по кислотному числу (табл. 15), свидетельствует о том, что в случае хранения не консервированной свиной шкуры более 12 часов, активность окислительных процессов нарастает до критического уровня (0,98%), что существенно влияет на органолептические показатели качества.

В данном случае, мы также вынуждены апеллировать к данным литературы (34), имеющим отношение к контролю качества мяса, согласно которым зна-

чение кислотного числа до 1,0 % характерны для свежего мяса, от 1-3 % - для мяса сомнительной свежести. Через 24 часа после хранения свиной дермы значение кислотного числа составляет 1,74 %, что уже является превышением допустимых норм для нормального сырья, через 36 часов оно увеличивается еще на 0,7 %.

Таблица 15

Динамика накопления и появления вторичных продуктов распада жировых веществ в дерме шкур крупного рогатого скота (I) и свиней (II) (средние значения, n=5)

Время, час.	Содержание жира в хлороформенном экстракте из известки, г		Объем 0,01 М раствора гидроксида калия, мл		Кислотное число, мг гидроксида калия	
	Анализируемый образец					
	I	II	I	II	I	II
4	0,495	0,524	0,1	0,13	0,11	0,14
6	0,456	0,492	0,13	0,25	0.16	0,29
8	0,422	0,477	0,2	0,4	0,27	0,47
12	0,388	0,401	0,4	0,7	0,58	0,98
24	0,256	0,291	0,6	0,8	0,95	1,74
36	0,231	0,276	1,0	1,2	2,42	2,44

Что касается дермы крупного рогатого скота, то в ней окислительные процессы протекают медленнее и максимальное количество вторичных продуктов распада жировых веществ можно обнаружить только через 36 часов после хранения.

Проведенные исследования позволили уточнить сроки наиболее активного проявления действия тканевых и микробных протео- и липолитических ферментов в снятой шкуре.

Как видно из таблицы 16, первичные продукты распада белков в дерме шкур крупного рогатого скота появляются уже через 6 часов, первичные продукты омыления жиров - через 24 часа. Максимальное количество продуктов вторичного распада белковых и жировых веществ появляются в ней через 24 и 36 часов, соответственно. В свиной дерме аналогичные процессы происходят раньше.

Установленные закономерности свидетельствуют о том, что сырье крупного рогатого скота в не консервированном состоянии можно хранить не более 6-8 часов, т.к. начиная с этого момента времени, микробиологические процессы

активизируются. Что касается неконсервированного свиного сырья, то для него таким критическим сроком являются 4-6 часов после снятия шкуры.

Таблица 16

Зависимость уровня расщепления белков (А) и глубины гидролитического распада жиров (В) от сроков хранения дермы шкур крупного рогатого скота (I) и свиней (II) в неконсервированном состоянии

Время, час.	I				II			
	Первичные продукты распада		Вторичные продукты распада		Первичные продукты распада		Вторичные продукты распада	
	А	В	А	В	А	В	А	В
4					±			
6	±				+		±	
8			±			±		±
12	+	±		±			+	
24			+			+		+
36		+		+				

"+" – указывает сроки максимального накопления продуктов распада
"±" - указывает сроки первичного появления продуктов распада

Обобщая приведенные данные, следует отметить, что хотя эксперименты носили поисковый характер, использованные методические подходы дают возможность быстро, достаточно просто и объективно оценивать качество животного сырья.

При проведении работ, связанных с накоплением и хранением производственных партий белоксодержащих отходов, как возможного сырья для наработки фибриллярных белков, особо важное значение приобретает постоянный контроль за развитием в автолизных и гнилостных процессов.

Начальную стадию процесса обнаружить органолептически невозможно. Однако зафиксировать этот момент крайне необходимо, так как от этого зависит не только качество сырья в партии, запускаемой в производство, но и качество получаемого конечного продукта.

Микроорганизмы, накапливаясь и размножаясь в сырье, в процессе своей жизнедеятельности выделяют различные ферменты: протеазы, липазы, оксидазы, дегидразы и др. (48).

Нами разработан метод, позволяющий по количеству редуктазы - фермен-

та, относящегося к группе дегидраз, судить о степени бактериальной обсемененности сырья (53). При этом количество фермента в исследованном образце и, соответственно, количество микроорганизмов, можно учитывать по степени обесцвечивания раствора резазурина - слабого органического красителя, являющегося в данном случае акцептором водорода и служащего индикатором не только наличия, но и активности фермента.

Результаты бактериоскопического контроля обсемененности использованного в работе сырья представлены на рис 12 - 14. На первом препарате никаких нарушений структурных элементов кожевой ткани обнаружено не было. На втором препарате ясно видно отслоение эпидермиса и нечеткие, размытые очертания волосяных сумок. На третьем препарате отчетливо виден распад структурных элементов дермы, как в сосочковом, так и в сетчатом слоях. Проведенные исследования позволили использовать в последующих экспериментах сырье с заранее установленной степенью бактериальной "загрязненности".

При отработке оптимальных режимов методики количественного определения редуктазы особое внимание было уделено подбору условий инкубирования исследуемых образцов, позволяющих наиболее полно экстрагировать микроорганизмы из навески (табл. 17).

Как видно из табл. 17, проба из парного сырья дает положительную реакцию на резазурин даже без предварительного термостатирования. Это объясняется тем, что жизнедеятельность микроорганизмов, попавших на поверхность шкуры из внешней среды, не подавлена консервантами. Для консервированного сырья инкубирование проб при 37,5 °С менее 2 часов является недостаточным. Несмотря на то, что в данных случаях было использовано сырье, явно пораженное микроорганизмами, оно без предварительного термостатирования давало отрицательную реакцию с резазурином. При инкубировании более 4-х часов под действием благоприятных условий среды начинается бурное размножение микроорганизмов и выделение ими редуктазы, в результате чего окраска резазурина в пробе даже неповрежденного микробами сырья обесцвечивается под действием фермента.

Таблица 17

Влияние времени инкубирования экстракта из сырья различных стадий порчи на изменение окраски резазурина

Время термостатирования проб, ч.	Окраска содержимого пробирок с экстрактом из :					
	неповрежденного сырья		сырья I стадии порчи		сырья II стадии порчи	
	Характеристика сырья					
	A	B	A	B	A	B
0	ярко-розовая	сине-сиреневая	обесцвечена на высоту 1 см (верх розовый)	сине-сиреневый	обесцвечена на высоту 2,5 см	сине-сиреневая
2	ярко-розовая	сине-сиреневая	обесцвечена на высоту 2 см.	ярко-розовая	обесцвечена на высоту 7,8 см	обесцвечена на высоту 4 см
4	ярко-розовая	сине-сиреневая	обесцвечена на высоту 7,5 см	обесцвечена на высоту 1 см	обесцвечена на высоту 7,9 см	обесцвечена на высоту 6 см
6	обесцвечена на высоту 1 см (верх ярко-розовый)	сиреневая	обесцвечена на высоту 7,5 см	обесцвечена на высоту 4 см	то же	обесцвечена на высоту 7,8 см
8	обесцвечена на высоту 7,8 см	ярко-розовая	обесцвечена полностью	обесцвечена на высоту 4 см	обесцвечена полностью	обесцвечена полностью
12	обесцвечена полностью	розовая	то же	обесцвечена на высоту 4,5 см	то же	то же

A – неконсервированное сырье; B – консервированное сырье.

В ходе проведенных исследований было показано, что для получения объективных данных, реально отражающих содержание микроорганизмов в кожевой ткани шкур по редуктазной пробе, подготовленные к исследованиям образцы необходимо выдерживать при 37,5 °С.

Рис. 12 Рис.13
Гистологический срез кожевой ткани неповрежденного образца (рис. 12) и образца I стадии порчи (рис. 13)

Рис. 14. Гистологический срез кожевой ткани образца II стадии порчи.

Время инкубирования для парного сырья 1-2 часа, для консервированного - 2-4 часа. Микробиологические исследования, проведенные параллельно с гистолого-бактериоскопическим анализом и с редуктазной пробой, позволили установить зависимость между степенью обесцвечивания раствора резазурина и количеством микроорганизмов в сырье (табл.18).

Таблица 18

Зависимость окраски пробы на редуктазу от количества микроорганизмов в сырье

Состояние исследуемого образца	Окраска пробы		Количество микроорганизмов в 1 г исследуемого образца, млн.шт.	
	Неконсервированное сырье	Консервированное сырье	Неконсервированное сырье	Консервированное сырье
Хорошее	Ярко-розовая	Сине-сиреневая	от 24 до 60	от 24 до 40
I стадия порчи	Обесцвечено 40 % высоты столбика (верхний слой розовый)	Ярко-розовая	от 60 до 80	от 40 до 70
II стадия порчи	Обесцвечено более 40 % высоты столбика жидкости (верхний слой розовый)	Обесцвечено более 25 % высоты столбика жидкости (верхний слой розовый)	от 80 и выше	от 70 и выше

Согласно табл. 18, если исследуемое консервированное сырье при проведении анализа дает сине-сиреневую окраску пробы, то можно сделать вывод о

том, что жизнедеятельность микроорганизмов в нем подавлена, и такое сырье может подлежать длительному хранению. Если проба окрашена в розово-сиреневый цвет, то на сырье имеется сравнительно небольшое количество функционирующих микроорганизмов и, хотя структура дермы не нарушена, такое сырье нуждается в постоянном бактериологическом контроле. Сырье, дающее ярко-розовую окраску пробы, не подлежит даже кратковременному хранению и в максимально короткие сроки должно быть направлено на переработку. При запуске в производство сырья, проба из которого частично обесцвечена необходимо вносить соответствующие коррективы в процессы переработки с учетом того, что структура дермы дестабилизирована.

Следует отметить, что редуктазная проба хорошо зарекомендовала себя при оценке бактериальной обсемененности не только коллагенсодержащих отходов, но и эластин- и кератинсодержащих материалов. Она дает возможность быстро, просто и достаточно объективно определить наличие или отсутствие гнилостных процессов в анализируемом сырье.

3.2. Химический состав белоксодержащих отходов

Использование белоксодержащих отходов в качестве исходного сырья для получения фибриллярных белков невозможно также без надежной комплексной оценки показателей, характеризующих его химический состав.

В табл. 19 представлены результаты сравнительного анализа основных показателей химического состава некоторых коллагенсодержащих отходов, проведенные с целью выбора наиболее приемлемого вида исходного сырья для наработки коллагена.

Как видно из табл. 19, содержание влаги в образцах ткани всех исследованных отходов примерно одинаково и колеблется от 71,80 до 74,48 %. Для сухожилий крупного рогатого скота этот показатель значительно ниже - 65,60 %. Выявленная разница обусловлена, вероятно, тем, что дерма в силу своих морфологических и функциональных особенностей имеет менее плотное переплетение коллагеновых волокон и к тому же разрыхлена включениями волосяных луковиц, потовых и сальных желез (50, 98, 115).

Процент минеральных веществ в сухожилиях и краевых участках шкур, по нашим данным, оказался ниже, чем в гольевом спилке и гольевой спилковой обрези, очевидно, за счет того, что сухожилия, лапы и лобаши были использованы в парном состоянии, а остальные анализируемые образцы были взяты после золения, во время которого в дерму проникают ионы кальция, увеличивая ее минеральную часть.

Что касается белковых веществ, то их количество в сухом остатке превалирует над остальными компонентами во всех видах исследованных образцов. Тем не менее, следует отметить, что больше всего белковых веществ находится в сухожилиях и гольевом спилке крупного рогатого скота 93,91 % и 92,02 % соответственно. Для гольевого спилка свиных шкур этот показатель несколько ниже (82,80 %), за счет большого содержания в данном виде отходов несвязанных жировых и минеральных веществ.

С учетом того, что определение содержания белковых веществ в исходных образцах было проведено по общему азоту и полученные данные включали в себя цифры, относящиеся как к коллагену, так и к неколлагеновым белковым компонентам, образцы были проанализированы на количественное содержание в них коллагена. Из данных, представленных в табл.19, следует, что больше всего коллагена присутствует в сухожилиях и гольевом спилке шкур крупного рогатого скота и меньше всего в гольевом спилке свиных шкур.

Образцы исходного сырья были охарактеризованы также и на предмет наличия в них биополимеров неколлагеновой природы. Как видно из табл. 19, обнаруженные в различных видах отходов соединительнотканные биополимеры неколлагеновой природы представлены глобулярными белками (1,53-2,37 %), о чем свидетельствует наличие тирозина в гидролизатах исследованных образцов (0,54-0,84 %) и углеводными компонентами, содержащими гексозы, гексозамины и уроновые кислоты (1,43 – 2,10 %).

В гольевом спилке и гольевой спилковой обрези шкур крупного рогатого скота и свиней содержание неколлагеновых биополимеров ниже, чем в краевых участках шкур, так как в процессе золения структура соединительной

Таблица 19

Химический состав некоторых видов коллагенсодержащих отходов животного сырья

Вид отходов	Влага, %	Содержание, % от абсолютно сухого вещества (n=5)							
		минеральные вещества	жировые вещества	общий белок	коллаген	неколлагеновые белки	углеводные компоненты		
							гексозы	гексозамины	уроновые кислоты
Краевые участки шкур крупного рогатого скота	73,18 ±0,98	2,59 ±0,12	5,21 ±0,25	90,7 ±1,84	87,12 ±0,44	2,37 ±0,04	0,82 ±0,021	0,68 ±0,014	0,54 ±0,015
Гольевой спилок шкур крупного рогатого скота	73,83 ±1,21	4,08 ±0,23	2,86 ±0,12	92,02 ±0,96	90,43 ±0,61	1,84 ±0,02	0,76 ±0,017	0,55 ±0,012	0,41 ±0,01
Гольевая спилковая обрезь шкур крупного рогатого скота	74,48 ±1,48	3,47 ±0,18	3,29 ±0,14	91,34 ±0,45	89,56 ±0,52	1,78 ±0,02	0,74 ±0,014	0,56 ±0,012	0,39 ±0,01
Гольевой спилок шкур свиней	71,80 ±2.03	4,25 ±0,2	11,86 ±0,49	82,80 ±0,55	83,41 ±1,06	2,04 ±0.02	0,89 ±0,024	0,63 ±0.010	0,58 ±0,02
Сухожилия крупного рогатого скота	65,60 ±0,87	1,3 ±0,06	2,9 ±0,13	93,91 ±0,83	91,06 ±0,28	1,53 ±0.03	0,67 ±0,009	0,49 ±0,005	0,27 ±0,006
Подслизистая оболочка тонких кишок овец	83,40 ±0,99	2,8 ±0,03	4,1 ±0,2	89,53 ±0,40	72,65 ±0,33	14,24 ±0,27	1,4 ±0,03	3,8 ±0,045	1,7 ±0.043
Перикард крупного рогатого скота	74,31 ±1,66	0,33 ±0,02	5,2 ±0,24	93,32 ±1,02	94,68 ±0,45	3,66 ±0,07	-	-	-
Плавательный пузырь осетровых рыб	65,71 ±2,20	4,37 ±0,31	16,91 ±0,81	74,82 ±1,16	65,65 ±0,70	8,80 ±0,19	1,75 ±0.028	1,14 ±0,023	0,83 ±0.025

ткани разрыхляется и часть межволоконных белково-углеводных комплексов растворяется и переходит в зольную жидкость. Незначительное содержание неколлагеновых биополимеров в сухожилиях коррелирует с высоким содержанием коллагена. Полученные результаты были использованы в дальнейшей работе для контроля за степенью очистки коллагена от сопутствующих биополимеров в процессе его растворения.

Наряду с белоксодержащими отходами кожевенного производства исследована также целесообразность использования для тех же целей отходов кетгутного, мясоперерабатывающего и рыбоперерабатывающего производств (табл. 19).

Сравнение химических составов трех вышеперечисленных видов отходов, как возможного исходного сырья для наработки коллагена, свидетельствует о том, что для всех них характерно высокое содержание влаги в парном состоянии, коллагена в белковой фракции, а также большее количество балластных веществ - неколлагеновых белков глобулярной природы, углеводных компонентов, жира, чем в недубленых отходах от шкур крупного рогатого скота и свиней.

Следовательно, в случае их использования, этот недостаток должен быть компенсирован более качественной очисткой таких коллагенсодержащих отходов как предполагаемого источника сырья для наработки коллагена.

Эластин, наряду с коллагеном, является характерным компонентом белоксодержащих отходов кожевенного и мясоперерабатывающего производства.

Комплексный анализ химического состава лобашей и выйной связки крупного рогатого скота (табл.20), проведенный в ходе поиска приемлемого исходного сырья для наработки эластина (137) свидетельствует о том, что доля белковых веществ в данных видах отходов высока (85,05 и 92,8 %, соответственно). Однако соотношение белковых компонентов в лобашах иное, чем в выйной связке. Так, в лобашах на долю коллагена приходится 80,49 % от сухого остатка, в выйной связке всего 6,79 %.

Таблица 20

Химический состав лобашей шкур и выйной связки крупного рогатого скота
(% от абсолютно сухого вещества, n=5)

Вид сырья	Жир	Зола	Общий белок	Коллаген	Глобулярные белки	Эластин	Углеводные компоненты		
							гексозы	гексозамины	уроновые кислоты
Лобаши	10,46 ±0,44	1,25 ±0,05	85,05 ±0,07	80,49 ±0,36	3,51 ±0,03	1,05	0,57 ±0,02	0,74 ±0,08	1,4± 0,02
Выйная связка	1,15 ±0,09	0,62 ±0,04	92,8 ±0,10	6,79 ±0,06	10,23 ±0,04	75,78	1,15 ±0,03	—	4,06 ±0,05

Таблица 21

Основные показатели химического состава некоторых видов кератинсодержащих отходов кожевенного и шерстеперерабатывающего производства

Анализируемый образец	Влага, %	Содержание, % от абсолютно сухого вещества (n=5)							
		минеральные вещества		жировые вещества	общий белок	белки, богатые тирозином	углеводные компоненты		
		всего	в т.ч., общая сера				гексозы	гексозамины	уроновые кислоты
Волос взрослого северного оленя	8,01 ±0.50	2,18 ±0,10	0,44 ±0.01	3,83 ±0.14	90,16 ±1,56	2,17 ±0,04	0,86 ±0,02	0,11 ±0,003	0,20 ±0,005
Волос крупного рогатого скота	11,14 ±0,79	2,51 ±0,09	0,28 ±0,008	5,36 ±0,22	90,09 ±1.39	1,52 ±0.029	0,78 ±0,01	0,24 ±0,003	0,22 ±0,005
Щетина	12,47 ±0.85	2,23 ±0.07	0,20 ±0.005	7,88 ±0,31	87,93 ±1,68	2,47 ±0,052	0,95 ±0,01	0,17 ±0,003	0,20 ±0.004
Очес шерсти	9,17 ±0,63	2,36 ±0.08	0,35 ±0.009	4,42 ±0,17	91,45 ±1,09	2,08 ±0,04	1,03 ±0.02	0,21 ±0,002	0,16 ±0.003

Содержание неколлагеновых белков в выйной связке примерно в 3 раза выше, чем в лобашах. Углеводов в ней, несмотря на отсутствие гексозаминов, также обнаруживается больше. Что касается жировых и минеральных веществ, то они присутствуют в выйной связке в меньших количествах, чем в лобашах. Анализ данных, представленных в табл.20, свидетельствует о том, что в обоих видах отходов суммарный процент коллагена и неколлагеновых белков меньше, чем количество общего белка. По всей вероятности, эта разница и характеризует количество эластина, содержащегося в исследуемых образцах; для лобашей она составляет 1,05 %, для выйной связки - 75,78 %. Полученные данные весьма убедительно свидетельствуют о целесообразности использования выйной связки для наработки эластина.

Как уже неоднократно отмечалось (43), специфика кожевенного, мясоперерабатывающего и шерстеперерабатывающего производств такова, что в процессе получения основной товарной продукции наряду с отходами образуется большое количество побочных продуктов в виде скотоволоса, шерсти или очеса шерстных волокон. Несмотря на определенные видовые особенности, все они являются роговыми образованиями эпидермального происхождения, состоящими в основном из кератиновых белков, определяющих структуру, химический состав и свойства волоса (87, 228, 290). С учетом того, что все объекты исследования представляют собой сложные многокомпонентные образования, на первом этапе работы необходимо было получить информацию об их химическом составе и с этой точки зрения дать оценку возможностей их переработки (табл. 21).

Характеристика исследуемых образцов по такому показателю как содержание влаги на начальной стадии анализа обусловлена не только необходимостью получения сопоставимых данных по остальным компонентам химического состава. Гидрофильные свойства кератина, также как коллагена и эластина, обусловлены определенным количеством активных групп, характерным для данного состояния белка в сочетании с термической устойчивостью этот показатель отображает общий энергетический баланс связей в белоксодержа-

щем материале (199).

Как видно из табл.21, содержание влаги во всех образцах варьирует в незначительном пределе - от 8,01 до 12,47 %. Наименьшее значение этого показателя выявлено для волоса северного оленя, наибольшее - для щетины. Количество минеральных веществ практически одинаково для всех видов волос (2,18-2,51 %). Тот факт, что этот показатель для волоса-сгонки крупного рогатого скота несколько выше, чем у остальных образцов, мы объясняем наличием определенной зависимости между величиной этого показателя и методом получения исходного сырья. В том случае, если съем шерсти со шкуры производится механическим способом, содержанием минеральных веществ в волосе ниже, чем при использовании намазных смесей.

Что касается содержания жировых веществ, то их количество в исходном сырье обусловлено, по всей вероятности, видовыми особенностями секретов сальных желез. Так, например, щетина свиней отличается повышенной зажиренностью - 7,88 %; величина этого показателя для волоса шерсти крупного рогатого скота, гребенного очеса и волоса северного оленя соответственно в 1,5; 1,8 и 2,8 раза ниже.

В количественном отношении белковые вещества во всех исследованных образцах преобладают над остальными компонентами. На их долю приходится около 90 % от сухого остатка, что свидетельствует о достаточно высоких возможностях использования вышеуказанных видов волос, как исходного сырья, для получения белковой субстанции, состоящей из растворимых производных кератина. Наличие в волосе различных структурных белков (табл.21) создает необходимость использования ряда химических воздействий, способствующих очистке кератина фибрилл волоса от балластных веществ. Помимо этого в технологическую схему получения нативного фибриллярного кератина обязательно надо включать процедуру обезжиривания.

Обобщая результаты анализа химического состава различных видов белоксодержащих отходов кожевенного, мясо- и шерстеперерабатывающего производств, следует подчеркнуть, что изучение химического состава позволило не

только объективно оценить их достоинства и недостатки, с точки зрения использования в качестве исходного сырья для наработки коллагена, эластина или кератина, но и предложить, в случае необходимости, технические решения, направленные на удаление присутствующих в сырье, наряду с фибриллярными белками, жировых и минеральных веществ, а также белково-углеводных комплексов и способствующие тем самым повышению степени очистки конечного продукта.

3.3. Изучение структурных особенностей коллаген-, эластин- и кератинсодержащих отходов

Неоднородность химического состава белоксодержащих отходов указывает на наличие сложной многоуровневой системы связей различной природы (от вандерваальсовых до ковалентных), объединяющих гистоструктурные элементы отдельных разновидностей соединительной и эпидермальной тканей в единое целое (от органотканевого до молекулярного) (113, 132, 191, 193).

Для того, чтобы целенаправленно нарабатывать высокоочищенные препараты фибриллярных белков из недубленых отходов кожевенных предприятий, а также из некондиционного сырья или побочных продуктов мясо- и шерстеперерабатывающих производств, необходимо с помощью определенных химических и физических воздействий вначале провести деструкцию связей и максимально ослабить взаимодействие между основным компонентом и сопутствующими ему веществами на тканевом уровне. Такой методический прием дает возможность удалить эти сопутствующие вещества при последующих обработках.

Следующий этап деструктивных изменений характеризуется разрывом межмолекулярных связей непосредственно в фибриллярных структурах коллагена, эластина и кератина, что позволяет получать молекулярно-диспергированные растворы этих белков в нативном состоянии.

Это означает, что процесс выделения фибриллярных белков, включая их солюбилизацию (принудительное растворение), должен затрагивать все типы межмолекулярных взаимодействий, кроме тех связей, которые ответственны за

сохранение нативной молекулярной структуры коллагена, эластина и кератина.

Поскольку фибрилла является элементом надмолекулярной структуры белка и подвергается разрушению только на стадии ее растворения, следует ожидать, что на этапах химической обработки исходного сырья, предшествующих растворению, должен происходить разрыв преимущественно низкоэнергетических связей, образующих «мостики» между макроструктурными элементами белоксодержащих тканей (пучками волокон и волокнами), т.е. «деполимеризация» их до фибрилл (16, 17, 21).

В данном случае речь идет, во-первых, о вандерваальсовых силах ориентационного, индукционного и дисперсионного характера, имеющих заметную величину на расстояниях между структурными элементами порядка 0,1-1,0 нм. Энергия этих связей обычно не превышает 4 кДж/моль. Сюда же следует отнести ионные связи, возникающие в результате взаимодействия боковых групп основного и кислотного характера и водородные связи, образующиеся между атомами кислорода, азота, фтора, хлора и серы. Они играют существенную роль в обеспечении структурной стабильности фибриллярных белков и содержащих их тканей. Энергетический уровень водородных связей невелик и находится в пределах 8-40 кДж/моль и зависит от степени электроотрицательности атома, с которым водород взаимодействует через эту связь. Однако, общая энергия сил межмолекулярного взаимодействия, обусловленного этими типами связей, может достигать значительной величины, ввиду их многочисленности, поскольку на долю атомов водорода в фибриллярных белках приходится более 50 % от общего числа всех атомов. Несомненно, межмолекулярное взаимодействие на тканевом уровне обусловлено наличием между структурными элементами поперечных связей не только не ковалентного, но и ковалентного типа. Энергия ковалентной связи составляет величину порядка 300 кДж/моль. Однако, их количество весьма незначительно. С учетом того, что именно характер межмолекулярного взаимодействия обуславливает определенное агрегатное состояние вещества (15), становится очевидным, что для очистки фибриллярного белка от сопутствующих ему компонентов, в частности протеогликанов и гликопротеи-

нов, необходимо затратить энергию, превышающую энергию поперечных ковалентных связей. В связи с вышеизложенным, определенный интерес представляло изучение энергетических показателей, характеризующих архитектонику коллаген-, эластин- и кератинсодержащих тканей в нативном состоянии. Благодаря объективной информации о количестве и энергетическом спектре связей, скрепляющих структурные элементы тканей в единое целое, можно более обоснованно осуществлять целенаправленную наработку отдельных фибриллярных белков. На рис.12-15 представлены серии графиков, характеризующих изменения деформации образцов гольевого спилка, выйной связки (парной и проавтоклавированной) и шерстных волокон очеса тонкорунных овец при различных значениях внешнего механического напряжения и температуры. Из приведенных графиков следует, что с увеличением температуры исследуемые образцы в начале незначительно удлиняются. Вероятнее всего, это происходит за счет упорядочивания и продольной ориентации структурных элементов в результате напряжения межмолекулярных связей в аморфных зонах фибриллярных белков (21, 22,).Последующее медленное повышение температуры среды, в которой производится нагрев образца, приводит к усилению движения сегментов белковых структур. По достижении температуры, называемой температурой начала гидротермического сокращения ($T_{нгс}$), начинается процесс ослабления межмолекулярного взаимодействия и необратимого разрушения межмолекулярных связей, в результате чего длина образца сокращается, т.к. белок из фибриллярного состояния стремится перейти в глобулообразное (82). Такое изменение фазового состояния обусловлено разрушением кристаллических зон в структуре фибриллярного белка (81).

Как следует из представленных в табл. 22 экспериментальных данных, температура начала гидротермического сокращения непосредственно зависит от механического напряжения исследуемого образца (σ).

Процесс напряжения и разрыва межмолекулярных связей в образце, ведущий к его сокращению, продолжается до достижения температуры текучести

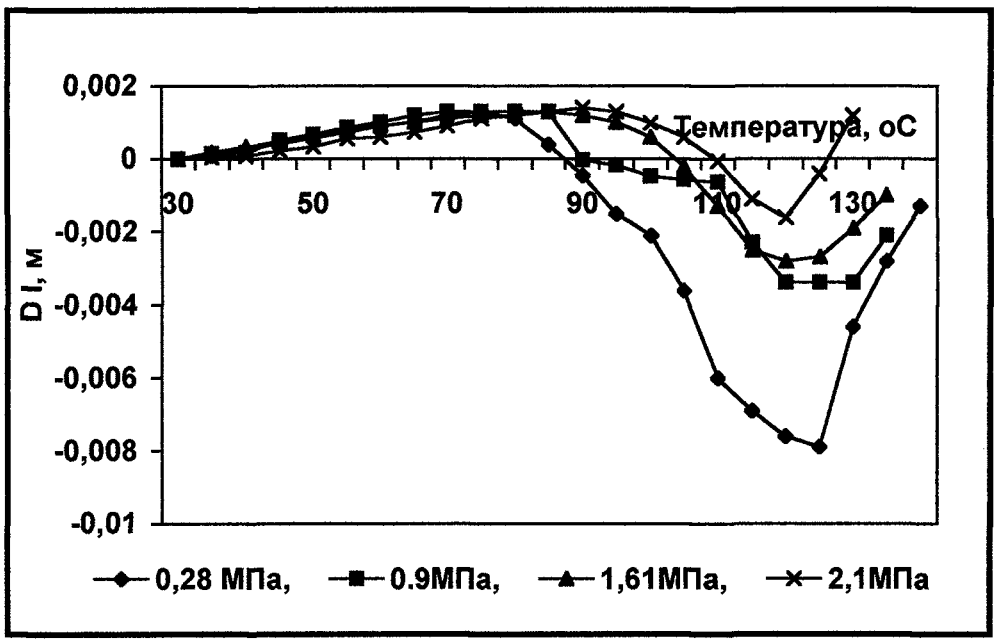


Рис.12. Изменение линейных размеров гольевой спилковой обрези под действием температуры и нагрузки

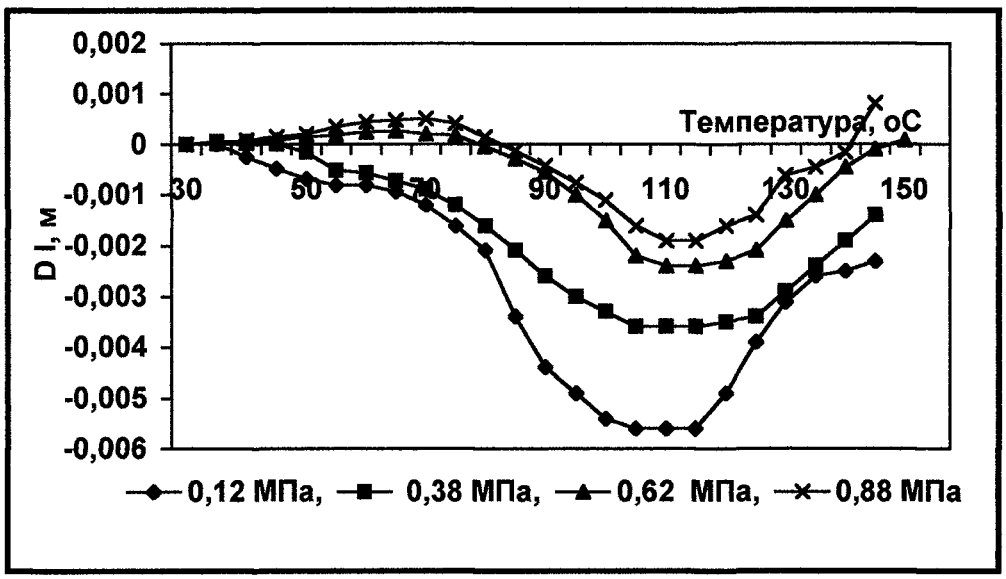


Рис. 13. Изменение линейных размеров парной выйной связки крупного рогатого скота под действием температуры и нагрузки

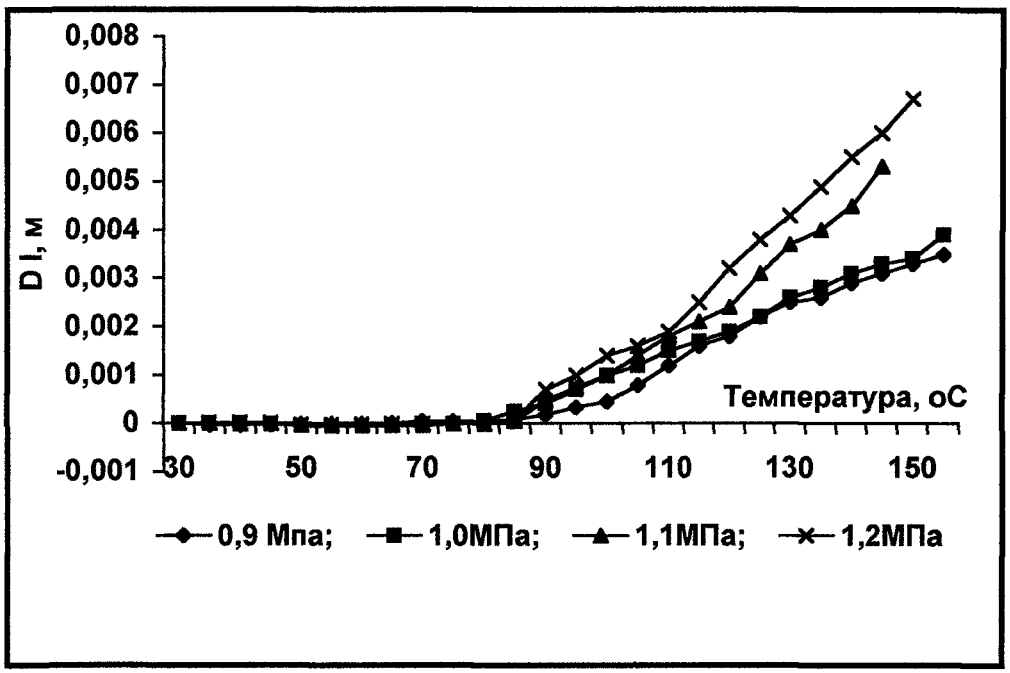


Рис.14. Изменение линейный размеров выйной связки крупного рогатого скота после автоклавирования под действием температуры и нагрузки

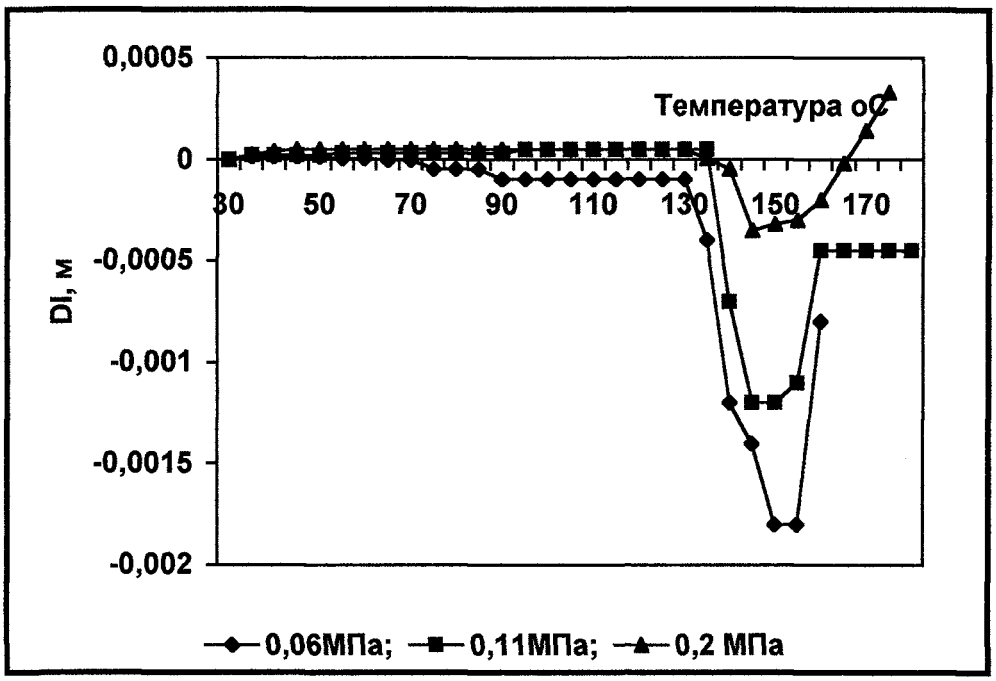


Рис. 15. Изменение линейных размеров шерстного волокна под влияниемтемпературы и нагрузки

Таблица 22

Энергетические параметры структурной стабильности белоксодержащих материалов

Анализируемый образец	Основной белковый компонент	Внешнее напряжение σ, МПа	Температура начала гидротермического сокращения, $T_{нгс}$, °С	Работа тепловой деформации при $T \le T_{нгс}$, А, к Дж/моль	Усредненное количество условно напряженных связей, n, $моль^{-1}$	Температура текучести, $T_т$, °С	Работа тепловой деформации при $T > T_{нгс}$, А, кДж/моль	Усредненное количество условно разорванных связей, n*, $моль^{-1}$	Количество условно напряженных связей, n, $моль^{-1}$, при 165 °С
Гольевой спилок шкур крупного рогатого скота	коллаген	0,28	70	62	2,2	125	540	160	—
		0,9	75	65	22	125	580	170	—
		1,61	85	130	45	125	650	190	—
		2,1	90	190	64	125	690	260	—
Выйная связка крупного рогатого скота (парная)	эластин (80 %) + коллаген (20 %)	0,125	35	0,05	0,02	115	20	37	—
		0,375	45	0,09	0,04	115	340	100	—
		0,625	65	17	5,9	115	370	110	—
		0,875	70	50	18	115	390	120	—
Выйная связка крупного рогатого скота	эластин	0,9							75
		1,0							120
		1,05							270
		1,25							560
Очес шерсти тонкорунных овец	кератин	0,06	60	0,005	0,002	150	1,09	0,5	—
		0,11	130	0,2	0,07	150	8,3	2,4	—
		0,2	130	0,2	0,07	150	10	3,0	—

($T_т$).

Затем, образцы вновь начинают удлиняться, вероятно, за счет напряжения и последующего разрыва более прочных, продольно ориентированных ковалентных связей. Не исключено, что при температуре более высокой, чем температура текучести, происходит разрыв внутриспиральных связей.

Обращает на себя внимание тот факт, что характер термодеформационных изменений парной выйной связки в исследуемом интервале температур (рис.13) обусловлен, по всей вероятности, не столько наличием в ней эластина, сколько коллагена. Так, данные по величине $\mathbf{T_{нгс}}$ для выйной связки близки к аналогичным показателям гольевого спилка. То же можно сказать и о температуре текучести. Очевидно, кратковременные температурные воздействия не оказывают влияния на основной белковый компонент парной выйной связки в виду его термостабильности (16) и все наблюдаемые термоэффекты обусловлены присутствием в ней около 20 % коллагена.

Термодеформационные исследования выйной связки после ее автоклавирования позволяют наблюдать изменения, происходящие с эластином, свободным от сопутствующих ему в парной выйной связке белковых компонентов. Как видно из рис. 14 и табл. 22, в чистом эластине в проанализированном интервале температур гидротермическое сокращение не происходит. Напряжение связей начинается после 150 °С. Скорее всего, это связи десмозиновой природы (156, 158).

Описанные термоэффекты характерны для фибриллярных белков, составляющих основу проанализированных образцов, и четко просматривается на термодеформационных кривых (**ТДК**) (рис.12-15).

Несмотря на высокую степень аналогии, указывающую на единую природу происхождения фибриллярных белков, ТДК несут на себе отпечаток индивидуальных особенностей каждого белка.

Так, эндотермический максимум на кривых ТДК, соответствующий началу гидротермического сокращения, для коллагена гольевого спилка находится в интервале температур 70-90 °С, для эластина из парной выйной связки от 35 до

Таблица 23

Термодинамические параметры, характеризующие плавление белоксодержащих материалов

Анализируемый образец	Основной белковый компонент	Энергия вязкотекучего перехода ΔH, кДж/моль	Температура начала гидротермического сокращения при нулевом напряжении, $T_{нгс}$, °C	Температурные пределы изменения фазового состояния, °C $\Delta T=T_т - T_{нгс}$	Молярная теплоемкость, $c=\frac{\Delta H}{\Delta T}$ Дж/моль град.	Теплоемкость сегмента/звена, $C_v=\frac{C}{n}$ Дж/моль град.
Гольевой спилок шкур крупного рогатого скота	коллаген	190	56,5	56,5	3363	1,5R
Выйная связка: -парная;	эластин + коллаген	420	63	52	8064	8,0R
-автоклавированная	эластин	75	—	25	3000	3,0R
Шерсть овцы	кератин	210	45	105	2400	5,0R

70 °С, для эластина из выйной связки после автоклавирования - исследованном интервале температур не обнаружен, для кератина овечьей шерсти от 60 до 130 °С.

Экзотермический минимум ТДК находится, соответственно, в интервалах температур 123-127 °С; 110-115 °С; не выявлен; 145-155 °С. Причина появления максимума связана, как считают некоторые авторы (21), с удалением адсорбционной влаги, сопровождающимся сближением молекул и, вследствие этого, некоторым нарастанием межмолекулярного взаимодействия. Перегиб на ТДК можно рассматривать как результат начала тепловой денатурации, ведущей к нарушению равновесия между структурирующими и глобулирующими силами макромолекул и обуславливающий переход типа «спираль-клубок» (193). Естественно, этот процесс происходит как в кристаллических, так и аморфных зонах фибриллярных структур и носит кооперативный характер. Однако макромолекулы из менее ориентированных аморфных зон должны глобулироваться при более низких температурах, чем это имеет место для кристаллических зон, в результате чего наблюдается температурно-временной интервал перехода из твердого состояния в вязко-текучее.

Различия, наблюдаемые при сравнении ТДК, относящихся к различным видам тканей, обусловлены, вероятно, именно соотношением кристаллических и аморфных областей в отдельных фибриллярных белках, а также степенью их структурирования за счет разного числа поперечных межмолекулярных связей различной природы. Чем больше доля кристаллических областей и степень структурирования аморфных зон, тем более высокие значения имеют $\mathbf{T_{нгс}}$ и $\mathbf{T_т}$.

Так, например, у эластина (из проавтоклавированной выйной связки), для которого характерно значительное преобладание аморфного компонента над кристаллическим (108, 156, 158), эти показатели ниже, чем у коллагена. В свою очередь, коллаген обладает меньшей кристалличностью, чем кератин. Все это тесно связано с функциональными особенностями белка, в частности, с необходимостью выдерживать силовые напряжения в организме (113, 190).

Несомненный интерес представляет информация о видах связей, разру-

шающихся в температурном интервале между максимумом и минимумом ТДК, принадлежащих различным белкам.

Как свидетельствуют результаты наших экспериментов (табл.22), по всей вероятности, в основном происходит разрыв водородных связей различной степени прочности, что согласуется с опубликованными ранее данными (16).

Разумеется, учитывая кооперативный характер сил межмолекулярного взаимодействия, нельзя не принимать во внимание существование ковалентных межмолекулярных связей. Практическое отсутствие эндоэффекта высокоэнергетических связей – пептидных, сложноэфирных, дисульфидных и др., объясняется, вероятно, их относительной малочисленностью.

Энергия, необходимая для разрыва межмолекулярных поперечных связей различной природы и перевода образца в вязко-текучее состояние накапливается в нем постепенно по мере увеличения температуры образца.

Нагревание анализируемых образцов, состоящих, главным образом, из фибриллярных белков, сопровождается изменением внутренней энергии архитектоники всей системы белковых элементов, начиная от пучков волокон, волокон и составляющих их фибрилл, заканчивая молекулами белка и пептидными цепями. Естественно, при нагревании влияние энергии теплоносителя на элементы, принадлежащие к разным уровням белковой структуры, неодинаково. Так, низкие температуры воздействуют, в основном, на элементы макроструктуры, такие, как пучки волокон и волокна. Повышение температуры приводит к увеличению расстояния между элементами, т.е. к тепловому расширению. Дальнейшее повышение температуры до величин, соответствующих $T_{нгс}$ и более, воздействует на тонкую структуру фибриллярных белков и приводит к ее деструкции. В этом случае энергии, запасенной белковой структурой, становится достаточно, чтобы преодолеть напряжение и осуществить постадийный разрыв нековалентных поперечных связей. Еще большее повышение температуры и, соответственно, накопленной энергии, приводят к началу вязко-текучего состояния, при котором рвутся практически все поперечные связи между микрофибриллами, в том числе и ковалентные. Последующее увеличение температуры

вызывает, вероятно, напряжение и разрыв продольно ориентированных межмолекулярных связей, что внешне проявляется как вязко-текучее состояние, хорошо видимое под нагрузкой.

При разрыве связей элементы белковых структур приобретают большее значение степеней свободы, что характеризуется скачком теплоемкости. Это, в свою очередь, способствует постепенному накоплению потенциальной энергии и при достижении определенного уровня приводит к разрыву высокоэнергетических связей, т.е. к переводу макроструктурных элементов системы в другое фазовое состояние (табл.23).

В табл. 23 представлены результаты расчетов величин энергии, необходимых для перевода образцов в вязко-текучее состояние, а также значения теплоемкостей, являющихся функцией процесса изменения состояния системы. Как видно из табл. 23, значения величин энергии ΔH каждого из трех типов биополимерных систем обусловлены их структурными особенностями. Так, энергия вязко-текучего перехода для коллагена из гольевой спилковой обрези меньше, чем для коллаген-эластинового белкового комплекса, составляющего основу парной выйной связки. Очевидно, для разрыва межмолекулярных поперечных связей в парной выйной связке требуется затратить гораздо больше энергии. Те изменения, которые имеют место в интервале температур от 30 °С до 180 °С, затрагивают только коллагеновые структуры и в очень малой степени эластические. Тем не менее, именно присутствие эластина ведет к увеличению энергии вязко-текучего перехода. Для того, чтобы осуществить фазовый переход в таком материале как выйная связка необходимо более мощное температурное воздействие, т.к. известно, что эластин является самым термостабильным белком. Величина энергии, необходимой для перевода шерсти в вязко-текучее состояние, несколько превышает значения этого показателя для гольевого спилка. Скорее всего, это обусловлено энергетическим спектром связей.

При расчете теплоемкости исследуемых материалов необходимо знать температурные пределы изменения их фазовых состояний, т.е. разницу между $T_т$ и $T_{нгс}$. В связи с тем, что нагрузка противодействует термической усадке об-

разцов, целесообразно использовать в последующих опытах значения $T_{нгс}$ при нулевом напряжении. Именно эта величина, определяемая экстраполяцией на нулевое значение графика зависимости температуры начала гидротермического сокращения от внешнего напряжения на исследуемый образец, является постоянной для каждого из проанализированных белковых веществ. Значения теплоемкости сегмента/звена **Cv** были рассчитаны при условии, что **C=R**. Это оправдано тем, что величина энергии единичной связи совпадает с энергией броуновского движения, которая сообщается исследуемому образцу через теплоноситель. Принимая за основу рассуждение о том, что количество разорванных межмолекулярных связей в результате фазового перехода должно быть максимальным, а это возможно лишь при наибольших нагрузках, при расчете теплоемкостей использовали именно такие значения **n*** (табл. 22). Как видно из результатов, представленных в табл.23, для гольевого спилка эта величина отличается от R в полтора раза, т.е. с момента начала гидротермического сокращения до вязко-текучего перехода энергия изменяется в полтора раза быстрее, чем температура теплоносителя. Для выйной связки эта величина отличается уже в 8 раз, для проавтоклавированной выйной связки – в 3 раза, для шерсти – в 5 раз.

Приведенные соображения дают возможность уточнить энергетический интервал изменений при термодеформациях различных белоксодержащих материалов и позволяют представить энергетическую картину связей в белоксодержащих тканях с тем, чтобы обоснованно разрабатывать технологический цикл их переработки.

Всестороннее изучение различных видов белоксодержащих отходов позволило выявить ряд общих закономерностей в структурных особенностях, химическом составе и исходных свойствах тканей, содержащих фибриллярные белки, предложить систему оценки их качества, что в свою очередь дало возможность рекомендовать их как сырье для получения новой товарной продукции.

Следующий этап работы заключался в разработке способов целенаправленного получения коллагена, эластина и кератина из отходов с учетом их строения и химического состава.

ГЛАВА 4. Разработка способов получения высокоочищенных препаратов коллагена, эластина и кератина из белоксодержащих отходов сырья животного происхождения

Информация о биохимическом составе, энергетических параметрах и других свойствах белоксодержащих отходов позволяет более обоснованно и эффективно использовать определенные химические воздействия и их комбинации для очистки основного белкового компонента в каждом конкретном виде исходного сырья от сопутствующих ему белково-углеводных соединений, являющихся, в данном случае, балластными веществами, и его последующего растворения.

4.1 Коллаген

Анализ научно-технической и патентной литературы, а также результаты собственных исследований свидетельствуют о том, что химическую модификацию коллагенсодержащих отходов можно осуществлять (выполнять) в двух направлениях:

- получая фибриллярный коллаген с сохраненной трехмерной структурой, максимально очищенный от биополимеров и веществ неколлагеновой природы, присутствующих в соединительной ткани; такой подход открывает путь к созданию биоматериалов и трансплантатов на основе фибриллярного коллагена (20, 42, 70, 172, 179, 184, 201, 346, 365);
- получая молекулярно-диспергированные растворы коллагена за счет разрушения межмолекулярных ковалентных связей в фибриллярном коллагене; в данном случае коллаген можно использовать или непосредственно, или применять в качестве матрицы для иммобилизации биологических и лекарственных веществ (37, 38, 41, 54, 60, 73, 97, 117, 125, 126, 136, 150, 170, 171, 173, 205, 237, 242, 249, 370, 375, 406).

Принимая во внимание возрастающую потребность в коллагеновых препаратах различных форм и назначений, были изучены возможности получения как фибриллярного, так и диспергированного коллагена из недубленых отходов кожевенного производства.

4.1.1. Получение фибриллярного коллагена.

Приступая к разработке способа получения нерастворимого коллагена как возможного биологического покрытия, мы не случайно избрали объектом исследований гольевой спилок свиных шкур, непригодный для производства кожи.

Во-первых, такое временное покрытие весьма перспективно, т.к. свиная кожа наиболее близка по строению к человеческой и, после соответствующих обработок, вполне может отвечать требованиям, предъявляемым тканевым трансплантатам. Во-вторых, учитывая доступность и дешевизну исходного сырья и сравнительно невысокие затраты на его обработку, использование свиного спилка для производства препаратов ветеринарного и медицинского назначения целесообразно с экономической точки зрения.

В то же время процесс подготовки отдельных слоев дермы свиных шкур для использования в качестве временных покрытий на раны, исключающий растворение коллагена дермы, имеет ряд особенностей и связан с определенными трудностями.

Для того чтобы подобрать оптимальный вариант и режимы обработки свиного спилка, исключающие деструктивные изменения в надмолекулярной структуре коллагена, было изучено влияние щелочно-солевых и кислотно-солевых воздействий различной интенсивности и продолжительности на его химический состав (табл. 24) и физико-механические свойства (табл.25).

Несмотря на то, что механизм действия кислот и щелочей на коллаген детально описан в литературе (10, 41. 97, 98), этот этап работы, тем не менее, был необходим как вспомогательный для проведения последующих экспериментов.

Как видно из табл. 24, вид и продолжительность обработки образцов свиного спилка оказывают значительное влияние на отдельные показатели его химического состава. Например, содержание влаги в исследуемых образцах увеличивается прямо пропорционально степени интенсивности щелочно-

Таблица 24

Влияние различных обработок на химический состав свиного спилка

Анализируемый образец (свиной спилок)	Продолжительность обработки, час.	Влага, %	Содержание, % от абсолютно сухого вещества (средние значения, n=5)					
			зола	жир	белок	коллаген	гексозы	гексозамины
Необработанный	—	68,04	0,84	11,10	85,34	83,17	0,99	0,65
После обработки 3 % NaOH и 14 % Na_2SO_4	24	69,78	1,35	8,69	86,23	84,80	0.73	0,42
	48	70,89	1,49	8,08	86,39	84,98	0,70	0,34
После обработки 5 % NaOH и 14 % Na_2SO_4	24	70,85	1,63	7,26	88,63	87,42	0,58	0.29
	48	72,96	1,80	6,93	89,00	88,47	0,45	0,18
После обработки 8 % NaOH и 14 % Na_2SO_4	24	74,62	2,12	6,54	90,04	91,26	0,33	0,14
	48	76,09	2,27	6,17	90,10	90,05	0,34	0,10
После обработки 0,1н HCl и 14 % NaCl	12	68,31	0,96	9,94	86,06	84.19	0,78	0,53
	24	69,58	1,00	9,86	86,28	84,31	0,69	0,47

солевого воздействия.

В то же время более длительная обработка свиного спилка щелочно-солевым раствором, содержащим определенный процент щелочи, практически не увеличивает процент влаги в образце, очевидно за счет обезвоживающего действия соли.

При кислотно-солевых воздействиях также происходит дополнительная гидратация белковых компонентов дермы. Однако она гораздо менее выражена, чем при щелочно-солевых. Это обусловлено присутствием в растворах хлорида натрия, который подавляет набухание образцов в кислой среде гораздо сильнее, чем сульфат натрия в щелочной (98, 115).

Согласно результатам наших опытов, содержание минеральных веществ в образцах свиного спилка, подвергнутого различным химическим воздействиям, особенно возрастает при щелочно-солевых обработках. Установленный факт объясняется довольно прочной адсорбцией неорганических ионов, присутствующих в растворах, на волокнистых структурах дермы спилка. Этому также способствует большое разрыхление структуры спилка при щелочно-солевых обработках (10, 41, 49, 50, 156).

Данные о содержании жировых веществ наглядно свидетельствуют о преимуществе щелочно-солевых воздействий перед кислотно-солевыми, т.к. первые в большей степени способствуют удалению жировых веществ из свиного спилка за счет омыления жиров под действием щелочи. Однако, с увеличением срока обработки омыление жиров и, тем самым, удаление их из образцов свиного спилка замедляется, вероятно, из-за присутствия в рабочих растворах сульфата натрия в постоянно высоких концентрациях.

Использованные в данном эксперименте химические воздействия не могут не отражаться на содержании белковых веществ в спилке. В условиях кислотно-солевой обработки происходит частичное растворение и вымывание глобулярных белков, вследствие чего количество белка в образце незначительно уменьшается.

Действие щелочи, ведущее к разрушению межфибриллярного цементи-

рующего вещества, сопровождается еще более выраженным снижением содержания белковых веществ (135). Несмотря на то, что согласно нашим данным, количество белковых веществ при кислотно-солевой и щелочно-солевых обработках спилка увеличивается, здесь нет противоречия с результатами других авторов (201), т.к. в данном случае содержание белка рассчитывали по отношению к абсолютно сухому остатку и, естественно, по сравнению с необработанным спилком оно возрастало, вследствие удаления из анализируемых образцов минеральных, жировых и др. балластных веществ, хотя в абсолютных единицах этот показатель, конечно, уменьшается.

Оценивая содержание коллагена, следует отметить, что по отношению к абсолютно сухому остатку количество его в анализируемых образцах в результате химических воздействий на спилок увеличивается и по мере возрастания интенсивности щелочно-солевых обработок приближается к величинам, характеризующим содержание общего белка. Это свидетельствует о практически полном удалении из образцов белковых компонентов неколлагеновой природы. Причем, по всей вероятности, величина этого показателя будет оставаться на данном уровне до тех пор, пока условия отработки не приведут к разрушению коллагенового волокна.

Особый интерес для нас представляло изучение влияния различных обработок на содержание в свином спилке межфибриллярного цементирующего вещества, представленного двумя видами белково-углеводных комплексов - гликопротеинами и протеогликанами (55, 61, 114, 133, 135).

Как видно из табл.24, по мере увеличения интенсивности используемой обработки количество нейтральных углеводов и гексозаминов, по которым мы судили о наличии углеводных компонентов в спилке, уменьшается и доходит до определенных пределов. Остающиеся гексозы, по-видимому, очень тесно связаны с фибриллярным коллагеном или входят в состав его макромолекул (113, 156, 201). Что касается гексозаминов, то резкое уменьшение их количества свидетельствует об удалении гексозаминов и, тем самым, о разрушении цементирующего вещества и возможной дезагрегации фибрил-

лярных структурных элементов в волокнах (98, 201).

Результаты наших опытов по изучению влияния различных химических воздействий на физико-механические свойства свиного спилка суммированы в табл.25.

Таблица 25

Изменение физико-механических свойств образцов свиного спилка под влиянием различных химических обработок

Условия обработки свиного спилка	Продолжительность обработки	Физико-механические характеристики образцов		
		температура сваривания, °С	предел прочности при растяжении, н/м	пористость, %
Необработанный спилок	—	66±0,5	(4,14±0,31)x10^7	4,72±0,12
После обработки 3% NaOH+14% Na_2SO_4	24	49±0,5	(1,86±0,17)x10^7	6,17±0,14
	48	47±1,5	(1,59±0,22)x10^7	7,05±0,33
После обработки 5% NaOH+14% Na_2SO_4	24	46±0,5	(1,47±0,12)x10^7	9,90±0,29
	48	43±0,8	(1,24±0,31)x10^7	11,07±0,11
После обработки 8% NaOH+14% Na_2SO_4	24	39±1,5	—	12,1±0,29
	49	34±2,0	—	15,04±0,20
0,1н HCL+4% NaCL	12	58±1,2	(3,84±0,25)x10^7	4,78±0,15
	24	55±1,0	(3,70±0,14)x10^7	4,98±0,24

Физико-механические свойства образцов свиного спилка претерпевают значительные изменения под действием едкого натра. Так, с увеличением концентрации щелочи снижается температура сваривания и прочность образцов, в то же время пористость их возрастает в 2-2,5 раза.

Полученные в этом опыте данные подтверждают результаты ранее выполненных нами экспериментов об освобождении фибриллярных коллагеновых структур от сопутствующих компонентов, и за счет чего увеличивается внутренняя поверхность образцов.

Установленные закономерности позволили выбрать режим щелочно-

солевого воздействия, разрушающий только цементирующее вещество и не затрагивающий коллагеновые структуры. Как видно из результатов, представленных в табл.25, наиболее эффективной является 24-часовая обработка спилка щелочно-солевым раствором, содержащим 5 % едкого натра.

Что касается кислотно-солевых воздействий, которые были использованы в качестве своеобразного контроля, то, по нашим данным, они не вызывают в свином спилке глубоких структурных изменений. Очевидно, что с их помощью можно удалить лишь те компоненты, которые связаны с коллагеном посредством слабых водородных связей.

Полученные результаты (133) позволили перейти к следующему этапу исследований - разработке технологической схемы получения временных биологических покрытий из гольевой спилковой обрези, поиску оптимальных режимов отдельных технологических стадий.

В виду того, что в качестве исходного сырья для наработки биоматериала на основе нерастворимого коллагена служил свиной гольевой спилок (или гольевая спилковая обрезь), полученный в результате двоения свиных шкур, прошедших операцию золения, в технологическую схему необходимо было включить процедуры, позволяющие перевести сырье в состояние, близкое к парному.

С этой целью была использована промывка спилка проточной водой, которая позволяет удалить продукты распада белков и жиров из волосяных сумок, а также несвязавшиеся химические реагенты, в частности, гидроксид кальция, используемый в промышленных условиях для золения дермы.

Известно (43, 98), что золеное голье содержит 4-6 % извести от массы сухого остатка, из которых 1,7 % химически связана с коллагеном. При этом образуется слабо диссоциирующее соединение кальция с коллагеном, которое при промывке проточной водой удалить не удается. Поэтому сырье после промывки подвергали обеззоливанию сульфатом аммония. Максимальный эффект был достигнут при обработке образцов 2,5 % (от массы голья) сульфатом аммония при температуре 25-30 °С. При таких условиях удается пол-

ностью провести обеззоливание за 1-1,5 часа.

Ввиду того, что повышенное содержание жировых веществ в биоматериале может отрицательно сказаться на его сорбционных свойствах, снизить качество и сроки хранения готового препарата, необходимо было особенно тщательно отработать операцию технологического цикла, связанную с обезжириванием свиного спилка. В этой связи была проведена апробация различных вариантов обезжиривания в сочетании со щелочно-солевой обработкой (табл.26).

Таблица 26

Изменение содержания жира в свином спилке в зависимости от способа обезжиривания

Условия обезжиривания	Содержание жировых веществ в свином спилке после обезжиривания (% от абс. сухого в-ва)	Количество удаленного жира, %
1. Спилок до обезжиривания	9,98±0,25	—
2. 5% NaOH+14% Na_2SO_4;24 ч.; 25°С; ж.к.=3	7,36±0,16	26
3. Обработка по варианту №2, затем 0,5% (от массы голья) липаза; 16 ч.; 30°С; ж.к.=3; pH 8,0-8,5	6,76±0,10	32
4. Обработка липазой (вариант №3), затем щелочно-солевая обработка (вариант №2)	6,71±0,05	33
5. 1% липазы от массы голья, 16 ч.; 38°С; ж. к.=3; pH 8,0-8,5, затем щелочно-солевая обработка (вариант №2)	4,44±0,55	56
6. 1% NaOH в 1М Na_2CO_3+5% ПАВ; 16 ч.; 28°С; ж.к.=3, затем щелочно-солевая обработка (вариант №2)	1,5±0,88	85

Как видно из табл.26, наиболее эффективным является обезжиривание щелочно-солевым раствором с добавлением поверхностно-активных веществ.

За процедурой обезжиривания в технологической схеме следует щелочно-солевая обработка. Эта операция является одной из основных в технологии получения временных биологических покрытий из нерастворимого коллагена.

Именно на этом этапе, благодаря оптимально подобранным режимам щелочно-солевого воздействия, создаются условия, позволяющие максимально удалить из спилка неколлагеновые биополимеры, не затрагивая при этом надмолекулярную структуру коллагена.

Для предотвращения гидролитического действия щелочи на коллаген, в технологическую схему была включена процедура солевой промывки образцов. Последовательное использование вслед за этим таких операций как нейтрализация и промывка проточной водой дало возможность полностью удалить из образцов остатки щелочи и солей.

В процессе получения временных биологических покрытий возникает необходимость в такой обработке, которая гарантировала бы стерильность препаратов, а также максимальную сохранность физико-химических и терапевтических свойств. Следует отметить, что немногие из существующих методов могут быть применены для стерилизации коллагеновых материалов. Весьма удобным и единственно возможным, по мнению (237), является облучение жесткими γ-лучами в дозе от 1,5 до 2,5 МРАД.

Кроме стерилизации, важен вопрос разработки способов упаковки и режимов хранения коллагенсодержащих препаратов, чтобы исключить влияние кислорода воздуха, света, колебаний температуры. Конечный продукт, полученный по данной технологической схеме, обезвоживали в спирте, отжимали, герметично упаковывали в двойные полиэтиленовые пакеты, обеспечивающие влаго- и газонепроницаемость, но свободно пропускающие γ-лучи в дозе 3,5 МРАД, и после стерилизации хранили в холодильнике при температуре 4±0,5°С в течение 1, 6 и 12 месяцев.

Контроль влияния режимов стерилизации и сроков хранения на свойства готового препарата показал, что такие показатели, как содержание влаги, белковых, минеральных и жировых веществ, температура сваривания, практически не изменяется в течение 1 года (25).

Разработанная технологическая схема получения ксенотрансплантата из свиной спилковой обрези представлена на рис. 16.

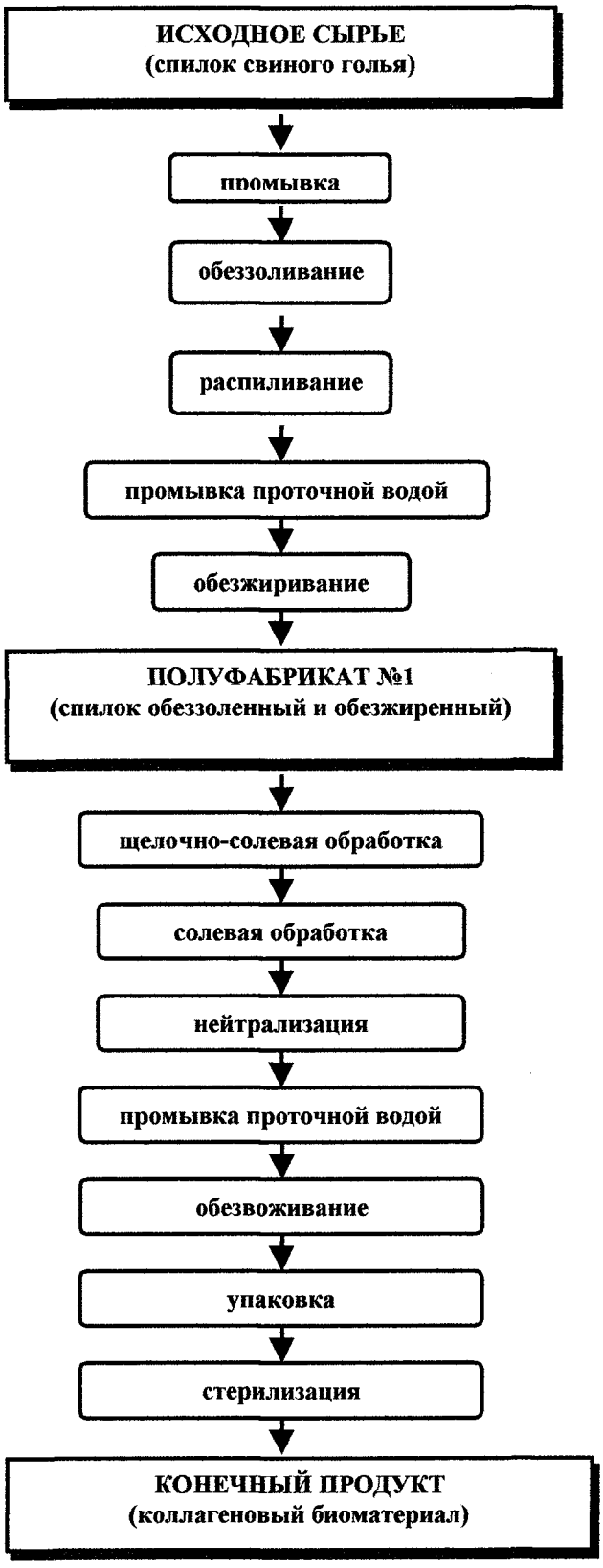


Рис. 16. Схема получения коллагенового биоматериала из свиного спилка

Параллельно с разработкой способа изготовления коллагенового биоматериала из отходов кожевенного производства проводился поиск методов контроля за ходом технологического процесса, позволяющих быстро и объективно оценить качество исходного сырья, полуфабриката и конечного продукта и выбрать контролируемые параметры, дающие максимум информации об исследуемом объекте.

На наш взгляд, в данной ситуации исключительно важное значение приобретают методы химического контроля качества, т.к. именно химический состав исследуемого образца, как было показано выше, определяет его физико-механические и биологические свойства.

Результаты постадийного контроля изменений химического состава свиного спилка с использованием традиционных методов анализа, рекомендуемых ГОСТом, приведены в табл.27.

Таблица 27

Основные параметры химического состава свиного гольевого спилка на отдельных стадиях его переработки в коллагеновый биоматериал, определяемые общепринятыми методами по ГОСТу

Образец	Содержание (% от абсолютно сухого вещества, n=5)		
	минеральные вещества	жировые вещества	гольевое вещество
Исходное сырье (свиной спилок)	3,09±0,03	8,18±0,33	86,35±0,02
Полуфабрикат (спилок обеззоленный и обезжиренный)	2,77±0,06	4,38±0,29	88,75±0,06
Готовый продукт (биоматериал)	2,54±0,06	3,04±0,12	91,03±0,02

Контроль проб исходного сырья, полуфабриката и готового продукта на содержание минеральных веществ свидетельствует о том, что этот показатель химического состава по мере обработки свиного гольевого спилка не претерпевает значительных изменений.

Контроль исследуемых образцов на содержание в них жировых веществ

позволил установить, что предложенный режим обезжиривания позволяет снизить количество жира в полуфабрикате примерно в два раза по сравнению с исходным сырьем. Предшествующая получению готового продукта щелочно-солевая обработка обеспечивает дальнейшее уменьшение концентрации жировых веществ еще в 1,4 раза.

Определение такого показателя химического состава как содержание общего азота дало возможность получить информацию о количественных изменениях в содержании белковых веществ в свином спилке в процессе его переработки в готовый биоматериал. Согласно полученным данным, количество белка по отношению и абсолютно сухому веществу в готовом продукте выше, чем в исходном сырье. Однако этот показатель не претерпевает значительных изменений.

Как видно из табл.27, из всех параметров химического состава, определяемых с помощью общепринятых гостовских методов, наиболее информативным является показатель, характеризующий содержание жировых веществ в исследуемом образце. По его величине можно судить о степени обезжиривания исходного сырья в процессе получения из него коллагенового биоматериала.

Ввиду того, что показатели химического состава, определяемые с помощью традиционно используемых методов, не позволяют в полной мере оценить качество исходного сырья, полуфабриката и готового продукта, была предпринята попытка охарактеризовать исходные образцы путем количественного анализа их тотальных гидролизатов на наличие мономеров (аминокислот, сахаров), специфичных для определенных классов соединительнотканных биополимеров. Такой методический подход дает возможность определить в исследуемых образцах содержание коллагена (по оксипролину), суммарного белкового компонента неколлагеновых биополимеров (по тирозину) и углеводных компонентов неколлагеновых биополимеров (гексоз и гексозаминов).

Постадийный контроль образцов путем анализа их тотальных гидролиза-

тов дает четкую картину изменений, происходящих с основными компонентами свиного спилка при обработке по данной технологии (табл.28).

Таблица 28

Параметры химического состава свиного гольевого спилка на отдельных стадиях его переработки в коллагеновый биоматериал, определяемые методом анализа тотальных гидролизатов

Образец	Содержание, % от абсолютно сухого вещества			
	коллаген	неколлагеновые биополимеры		
		суммарный белок	углеводные компоненты	
			гексозы	гексозамины
Исходное сырье (свиной спилок)	91,45± 0,600	1,680±0,003	0,502±0,009	0,972±0,010
Полуфабрикат (спилок обеззоленный и обезжиреный)	92,50± 0,840	0,920±0,015	0,450±0,004	0,768±0,006
Готовый продукт (биоматериал)	95,94± 1,360	—	0,425±0,010	0,538±0,010

Снижение суммарного белкового и углеводных компонентов при некотором увеличении содержания коллагена (по отношению к абсолютно сухому веществу) свидетельствует об очистке коллагена в препарате от неколлагеновых примесей, и, тем самым, о качестве получаемых временных биологических покрытий. Установленные закономерности дают основание для использования перечисленных выше показателей химического состава в качестве параметров, регламентирующих качество конечного продукта.

Сравнительный анализ данных, полученных в результате постадийного контроля образцов свиного спилка с помощью традиционных методов химического анализа по ГОСТу (табл.27) и методом анализа тотальных гидролизатов (табл.28) свидетельствует о том, что второй вариант контроля отличается большей информативностью.

На наш взгляд, оценка качества готового биоматериала не по содержанию в нем коллагена, а по концентрации неколлагеновых примесей является более целесообразной (135).

Однако, в связи с тем, что оценка готового биоматериала должна проводиться по целому ряду критериев, с учетом специальных требований, предъявляемых к подобного рода препаратам, анализ отдельных показателей химического состава конечного продукта обязательно должен быть дополнен лабораторно-экспериментальной проверкой его физико-химических и биологических свойств.

Получать биоматериалы "мембранного" или "каркасного" типа на основе нерастворимого коллагена можно не только из свиного спилка, но и из соединительнотканных оболочек желудочно-кишечного тракта и других органов и тканей (перикарда, висцеральной брюшины и т.д.).

Однако при этом следует всегда иметь в виду, что технологические приемы, направленные на получение коллагена, сохраняющего тканевый уровень организации структуры белка, должны быть обязательно объединены в единый цикл таким образом, чтобы достичь не только максимального эффекта очистки волокнистого коллагена за счет целенаправленного разрушения связей, обуславливающих его взаимодействие с жировыми и белково-углеводными и др. компонентами и последующего удаления этих веществ в ходе жидкостных операций, но и сохранить определенную прочность и эластичность в получаемом имитаторе ткани.

Следует отметить, что характер и интенсивность жидкостных операций во многом зависят от структурных особенностей исходного сырья, таких, например, как плотность компоновки и тип связи, расстояние между пучками коллагеновых волокон и отдельными волокнами, степень усадки ткани в процессе сушки. При обработке тканей с менее плотной упаковкой коллагеновых волокон и большим содержанием жира может возникнуть некоторое несоответствие между интенсивностью очистки, степенью разволокнения структуры и прочностными показателями материала.

При достижении необходимой степени разрыхления ткани, характеризующуюся высокими прочностными показателями, структура остается недостаточно очищенной. В то же время при достаточной "чистоте" биоматериала

снижается его прочность.

Нами предложено техническое решение (172), позволяющее избежать отмеченных выше недостатков и получить биоматериал с хорошо разрыхленной и максимально однородной волокнистой структурой, прочностными и эластическими свойствами, соответствующим цели его назначения за счет проведения 3-5 циклов жидкостных обработок, каждый из которых, в свою очередь, состоит из инкубации исходного коллагенсодержащего сырья вначале в пероксидно-щелочном, а затем в кислотно-пероксидном растворах в сочетании с промежуточными промывками полуфабриката водой до нейтральных pH.

Первый цикл обработки приводит к максимальному обводнению исходного сырья, частичному эмульгированию жировых веществ, удалению глобулярных белков. Следующий этап способствует более полной очистке коллагеновых структур полуфабриката от жира, углеводов, белков неколлагеновой природы за счет разрушения и удаления углеводно-белковых оболочек, образующих аморфные чехлы вокруг фибрилл коллагена, а также приводит к разволокнению агрегатов коллагеновых пучков. Последующие циклы ведут к дальнейшему повышению чистоты коллагена, ориентации и стабилизации его структурных субъединиц, которые в результате становятся достаточно мобильными благодаря очистке межволоконных пространств. Для того, чтобы исключить повышенное трение между структурными составляющими, которое может возникнуть при различного рода деформациях в биоматериалах, необходимо вводить пластификатор (например, глицерин и лимонную кислоту), что придаст ему дополнительные пластические свойства.

Результаты оценки качества полуфабрикатов подслизистых оболочек тонкого кишечника овец (I) и перикарда крупного рогатого скота (II), полученных в результате 4-х циклических обработок согласно предложенному нами способу, по комплексу химических, физических и биологических параметров представлены в табл. 29.

Согласно полученным данным, многократная обработка исходного колла-

Таблица 29

Некоторые показатели качества биоматериалов на основе волокнистого коллагена

Объект исследования	Вещества неколлагеновой природы, % от абсолютно сухого остатка					Индекс «чистоты» коллагена	Прочность на разрыв, $н/м^2$	Пористость, %	Сроки полного рассасывания под действием протеолитических ферментов
	жир	суммарный белковый компонент	углеводы, в т.ч.						
			гексозы	гексозамины	уроновые кислоты				
1	0,85±0,08	0,08±0,009	0,3±0,006	1,78±0,05	0,54±0,013	33	12±0,12	58,80±1,14	24
II	1,22±0,19	0,05±0,001	0,43±0,005	2,09±0,03	0,88±0,017	22,6	10,85±0,30	34,00±1,08	38

генсодержащего сырья окислительными композициями щелочного и кислотного типов значительно снижает содержание неколлагеновых компонентов за счет чего и увеличивается индекс "чистоты" коллагена в препарате (для сравнения см. табл.28).

Что касается физико-механических параметров, то они должны соответствовать цели назначения биоматериала. Так, например, для имитатора ткани, который должен быть использован в качестве биопротеза клапана сердца высокая пористость не желательна, тогда как биоматериал, который предполагается использовать в качестве временного биологического покрытия, должен обладать повышенной пористостью, чтобы хорошо впитывать тканевый экссудат, обеспечивать оптимальную влагопроницаемость, предотвращать плазмопотерю и инфицирование раны (184).

Описанные выше способы переработки коллагенсодержащих отходов построены на использовании таких химических воздействий, которые позволяют целенаправленно разрушить связи между коллагеном и сопутствующими ему веществами и удалить их в ходе жидкостных операций, сохраняя при этом трехмерную структуру волокнистого коллагена в биоматериале - имитаторе ткани.

4.1.2. Разработка способов получения растворов молекулярно-диспергированного коллагена.

Однако наряду с этим существуют методы селективного разрушения ковалентных межмолекулярных связей в результате чего так называемый зрелый нерастворимый коллаген удается с помощью органических кислот полностью или частично перевести в раствор - солюбилизировать без разрушения структуры их молекул (10, 41, 48, 97, 170, 171, 173).

Эти работы имеют большое значение для выяснения структуры коллагена и открывают еще более широкие возможности для использования этого биополимера.

Многие из известных способов получения растворов коллагена предполагают использование для предварительной обработки ткани дорогостоящих

реактивов, в частности, различных ферментных препаратов, которые действуют на коллаген более специфично, чем другие вещества: они отщепляют телопептиды, при этом трехспиральная конформация молекулы сохраняется (201, 242, 412).

Наиболее широко распространены способы методы щелочно-солевой подготовки тканей к растворению коллагена. Они достаточно подробно описаны в литературе, научно-технической и патентной документации (10, 41, 97, 156, 201) и при оптимально подобранных соотношениях щелочи и нейтральной соли, а также температурно-временных режимах обработки способны не нарушать структуру молекул коллагена.

Как известно (98), действие щелочи в присутствии соли сводится в основном к разрушению волокнистых структур, удалению сопутствующих веществ и разрыву межмолекулярных связей. Защитное действие солей при щелочной обработке обусловлено их обезвоживающим эффектом, способствующим уплотнению структурных элементов. После такой обработки очищенный от примесей коллаген приобретает способность растворяться в кислотах.

Однако, такого рода способы длительны, не всегда технологичны, т.к. требуют применения щелочей, солей и кислот в высоких концентрациях, а следовательно, сравнительно больших затрат на очистку сточных вод. Кроме того, далеко не все виды коллагенсодержащего сырья, переработанные в соответствии с перечисленными выше технологическими решениями, дают высококачественные растворы коллагена. Получаемые продукты растворения коллагена зачастую не соответствуют требованиям, предъявляемым к подобным препаратам фармацевтической и косметической промышленностью в виду наличия примесей, вызывающих аллергические реакции.

С целью усовершенствования технологии наработки принудительно растворенного коллагена и обеспечения высокого качества конечного продукта была поставлена серия поисковых экспериментов по отработке оптимальных условий процедуры подготовки различных видов коллагенсодержащих от-

ходов к солюбилизации.

В первую очередь, были проведены опыты, направленные на изучение стабильности структуры исследуемых материалов. Для этого определяли скорость выплавления желатина из всех видов исходного сырья и гидротермическую устойчивость образцов на разных стадиях обработки (табл.30).

Таблица 30

Скорость выплавления желатина из различных видов коллагенсодержащих отходов

Исследуемые материалы	Выплавляемый желатин, % от сухого вещества, n=3			
	Время обработки, мин.			
	15	30	45	60
Краевые участки шкур крупного рогатого скота	28,74	45,26	67,19	84,93
Гольевой спилок шкур крупного рогатого скота	36,29	55,62	73,88	88,01
Гольевая спилковая обрезь шкур крупного рогатого скота	32,70	56,75	70,67	86,34
Гольевой спилок свиных шкур	30,65	50,24	68,99	75,19
Сухожилия крупного рогатого скота	25,90	40,23	77,12	90,93

Как следует из данных, представленных в табл. 30, выплавление желатина интенсивнее происходит из образцов, подвергавшихся золению, чем из сухожилий. Объективную информацию о степени дестабилизации структуры белков в исследуемых видах отходов под воздействием различных химических реагентов дают показатели температуры сваривания (табл.31).

Как следует из таблицы, наибольшей гидротермической устойчивостью обладают сухожилия крупного рогатого скота, а наименьшей - спилок свиных шкур.

При переводе исходного сырья в растворенное состояние через 24 часа после начала щелочно-солевой обработки происходит резкое снижение гидротермической устойчивости всех видов сырья в среднем на 10-18 °С. В последующие 12 часов значения этого показателя уменьшились на 2-8 °С. При

Таблица 31

Динамика изменений температуры сваривания
в процессе обработки сырья (средние значения)

Исследуемые материалы	Температура сваривания, °С					
	До обработки	После обработки				
		щелочно-солевая			солевая	кислотная
		24 ч.	36 ч.	48 ч.	48 ч.	48 ч.
Краевые участки шкур	70	54	46	41	41	41
Гольевой спилок шкур крупного рогатого скота	67	49	44	41	40	39
Гольевая спилковая обрезь шкур крупного рогатого скота	65	48	46	42	41	41
Гольевой спилок шкур свиней	60	44	41	40	37	37
Сухожилия крупного рогатого скота	68	48	44	44	41	41

дальнейшей обработке температура сваривания сухожилий крупного рогатого скота снизилась до 44 °С. У остальных видов сырья этот показатель продолжал медленно уменьшаться и через 48 часов достиг 37 °С у спилка шкур свиней и 40-41 °С у отходов шкур крупного рогатого скота. В процессе солевой промывки и нейтрализации температура сваривания всех опытных образцов изменилась незначительно.

Таким образом, проведенные эксперименты показали, что чем выше содержание белка в исходном сырье, а соответственно, меньше липидов и минеральных веществ, тем быстрее происходит процесс дезагрегации коллагеновых фибрилл, а также удаление сопутствующих коллагену белковых и углеводных компонентов, связанных с ним ковалентными поперечными связями.

Не менее важное значение имело установление зависимости между содержанием белковых веществ в исходном сырье и готовом продукте. Для этого определяли массы полученных растворов после диализа, а также содержание в сухом остатке белковых веществ.

Следует отметить, что после подготовительных обработок сухожилия крупного рогатого скота и краевые участки шкур растворялись в слабых ор-

ганических кислотах полностью, а в растворах из гольевой спилковой обрези и спилка также визуально можно было наблюдать не растворившиеся фрагменты ткани. Объясняется это, по-видимому, тем, что ионы кальция Ca_2, оставшиеся в дерме после золения, взаимодействуют с сульфат ионами, введенными при щелочно-солевой обработке образцов, образуя нерастворимую в воде соль, которая откладывается на структурных элементах белка, что и затруднило его растворение. В связи с этим пришлось внести коррективы в методику растворения золеных отходов. В дальнейшем такое сырье вначале обрабатывали сернокислым аммонием (2,5 % от массы) в течение 1 часа, затем промывали проточной водой 8 часов, а затем обрабатывали по разработанной ранее технологической схеме.

Полученные продукты растворения диализовали против проточной воды до нейтральных значений pH с целью удаления низкомолекулярных веществ, а затем оценивали с точки зрения их химического состава (табл.32).

Таблица 32

Химический состав отдиализованных золей коллагена

Объекты исследований, полученные из:	Содержание влаги, %	Содержание, % от абсолютно сухого вещества		
		белковых веществ	несвязанных жировых веществ	минеральных веществ
- краевых участков шкур крупного рогатого скота	98,0	98,3	—	0,74
- гольевого спилка шкур крупного рогатого скота	98,0	98,7	—	0,62
- спилковой обрези шкур крупного рогатого скота	98,0	98,2	—	0,70
- спилковой обрези свиных шкур	97,8	96,2	2,9	0,37
- сухожилий крупного рогатого скота	97,7	99,9	—	0,01

Как следует из данных табл.32, наибольшее содержание сухого остатка наблюдается в золе коллагена, полученном из сухожилий крупного рогатого

скота, в остальных золях этот показатель колеблется от 2,0 до 2,2 %.

Максимальное содержание белка отмечено нами в отдиализованном золе коллагена из сухожилий крупного рогатого скота (99,9 %), а минимальное - в золях из спилковой обрези шкур свиней. В связи с тем, что минеральных веществ во всех исследованных образцах золей обнаружено менее 1 %, они на массовую долю белка в сухом остатке оказывают незначительное влияние.

Меньшее содержание белковых веществ в золе из спилка свиных шкур объяснятся присутствием в нем несвязанных жировых веществ в количестве 2,9 %. В остальных золях жировых веществ зарегистрировано не было. Учитывая то, что коллагеновые золи, предназначенные для получения коллагеновых матриц, должны быть максимально очищены от сопутствующих веществ, спилок шкур свиней перед растворением необходимо тщательно обезжиривать, используя разработанные для этих целей методические подходы (табл.26).

Проведенные эксперименты свидетельствуют о том, что существующая технологическая схема получения продуктов растворения коллагена нуждается в некоторых корректировках, в зависимости от вида перерабатываемого сырья. В частности, подготовительная стадия при получении растворов коллагена из сырья, прошедшего золение, должна включать операции, направленные на удаление ионов кальция, адсорбированных структурными элементами белков, а зажиренное - операции по максимально возможному их удалению.

Следующий этап исследований был направлен на изучение возможности снижения расхода реагентов, используемых в процессе наработки коллагена. В ходе получения коллагенового золя исходное сырье подвергается воздействию растворов сильных кислот, щелочей, а также насыщенных растворов неорганических солей. По окончании технологического цикла все эти растворы должны пройти соответствующую очистку, после которой их можно сливать в канализационную сеть.

Чем меньше концентрация применяемых растворов, тем дешевле очистка

сточных вод и меньше вреда для окружающей среды. Результаты экспериментов, направленных на снижение концентрации используемых реагентов и контроль происходящих при этом изменений приведены в табл. 33.

Таблица 33

Влияние концентраций реагентов и продолжительности предварительной щелочно-солевой обработки на процесс растворения коллагена

Вариант обработки	Контроль рабочих жидкостей на присутствие коллагена			Набухание, (%)			Выход белка по окончании растворения, %
	время, ч.			время, ч.			
	24	36	48	24	36	48	
I	+	+	+	42	70	15	—
II	+	+	+	73	106	128	—
III	+	+	+	40	64	96	—
IV	—	—	+	165	230	300	93
V	—	+	+	184	260	300	89
VI	—	+	+	200	280	300	86
VII	—	—	—	160	225	280	—
VIII	—	—	—	175	220	300	92
IX	—	—	+	200	300	300	94
X	—	—	—	86	120	200	—
XI	—	—	—	95	140	220	—
XII	—	—	—	100	180	250	—

Было исследовано 12 вариантов щелочно-солевой обработки, различающихся количественным содержанием щелочи и соли. Оказалось, что использование вариантов I-III ведет к тому, что сырье довольно быстро набухает, однако разрыхление его структуры происходит неравномерно, что приводит к большим потерям коллагена с поверхности образцов. Применение сульфата натрия в сочетании со щелочью снижает ионизацию белка и способствует более равномерному распределению щелочи между структурными элементами коллагена (98).

При изучении воздействия на гольевой спилок вариантов IV-XII, быстрого разрушения поверхностных слоев исследуемых образцов и потерь коллагена не происходит, о чем свидетельствуют отрицательные результаты проверки рабочих жидкостей с помощью качественной реакции на нативный коллаген.

Следует отметить, что присутствие в щелочных растворах сравнительно больших концентраций сульфата натрия (варианты VII и X) ведет к преобла-

данию обезвоживающего эффекта, вызываемого солью, над разрыхляющим действием щелочи, что затрудняет и замедляет процесс подготовки коллагена к растворению.

Исключением является вариант IV. Очевидно, соотношение компонентов в этом варианте является оптимальным, о чем свидетельствует не только высокий выход, но и качество конечного продукта. Этот вариант подготовительной обработки рассматривали как контрольный и именно с ним сравнивали результаты остальных опытов, направленных на снижение расхода реагентов.

Установлено, что при использовании вариантов обработки X-XII щелочи не хватает для разрыва межфибриллярных связей, что отражается на скорости процесса набухания и затрудняет получение высокоочищенного коллагена.

Наилучшие результаты были получены нами при использовании варианта IX щелочно-солевой обработки. В этом случае процесс подготовки коллагена к растворению не только не замедлился, но и ускорился в среднем на 10-12 часов, а качество коллагенового золя по всем показателям химического состава не уступало качеству золя, полученному по стандартной методике (табл.34).

Полученные результаты указывают на реальную возможность снижения расхода щелочей и солей, загрязняющих сточные воды в процессе производства коллагена.

Проведенные исследования позволили подобрать определенные химические реагенты и их сочетания, а также некоторую совокупность материальных воздействий, в том числе и ультразвуковых, которые дают основание расценивать использованные технологические приемы как новое техническое решение (патент РФ № 2031597).

Следует отметить, что предложенный способ получения коллагенового золя универсален, т.к. наработку коллагена можно осуществлять из любого вида коллагенсодержащих отходов, применяя в случае необходимости на

Таблица 33

Сравнительная характеристика химического состава коллагеновых золей, полученных при различных режимах подготовки коллагена к растворению

Образец	Содержание, % от абсолютно сухого вещества (средние значения)						
	коллаген по оксипролину	неколлагеновые белки по тирозину	углеводные компоненты			минеральные вещества	несвязанные жировын вещества
			гексозы	гексозамины	уроновые кислоты		
Гольевой спилок крупного рогатого скота (исходное сырье)	90,43	1,85	0,76	0,62	0,71	4,08	2,86
Коллагеновый золь, полученный по варианту IV	98,09	—	0,32	—	—	0,63	—
Коллагеновый золь, полученный по варианту IX	98,25	—	0,40	—	—	0,31	—
Коллагеновый золь, полученный по варианту XII	95,73	1,62	0,48	0,35	0,39	0,29	—

первых стадиях технологического процесса такие подготовительные операции как обеззоливание (для отходов шкур, прошедших золение) или обезжиривание (для отходов, содержащих более 10 % жировых веществ).

Кроме того, в новом способе количество гидроксида натрия и сульфата натрия, необходимые для качественного осуществления предварительной щелочно-солевой обработки сокращается, соответственно, в 2 и 4 раза. Следовательно, меньше реактивов потребуется для нейтрализации отработанных растворов при очистке сточных вод.

Продолжительность технологического цикла при проведении операций по предлагаемому способу без ультразвуковой обработки на 34 ч. меньше, чем по известному способу, а с применением ультразвука каждая операция сокращается в среднем в 5-8 раз.

Ускорение технологических процессов ультразвуком обусловлено возникновением вихревых микротечений, интенсивно перемешивающих жидкость вблизи поверхности раздела, снимающих диффузионные ограничения и облегчающих массоперенос. Микротечения возникают под влиянием ультразвука любой частоты, при этом меняются только их масштабы. Обычно параметры ультразвука подбирают из требований оптимизации того или иного технологического процесса, учитывая перечень разрешенных МЭК для технологического применения частот (например, 22; 44; 440; 880 Кгц).

Обеспечение высокого качества коллагенового золя достигается за счет того, что полученную путем предварительной щелочно-солевой обработки и растворения в органической кислоте (предпочтительно в уксусной) коллагеновую массу диализуют против проточной воды до нейтральных значений pH, удаляя все низкомолекулярные примеси, а затем (в зависимости от целевого назначения конечного продукта) перерастворяют в определенной органической кислоте (рис.17).

Так, если коллаген предполагается использовать в ветеринарных препаратах, целесообразно перерастворять его в молочной ($C_3H_6O_3$) или аскорбиновой ($C_6H_8O_6$) кислотах, в парфюмерно-косметических изделиях - в уксусной

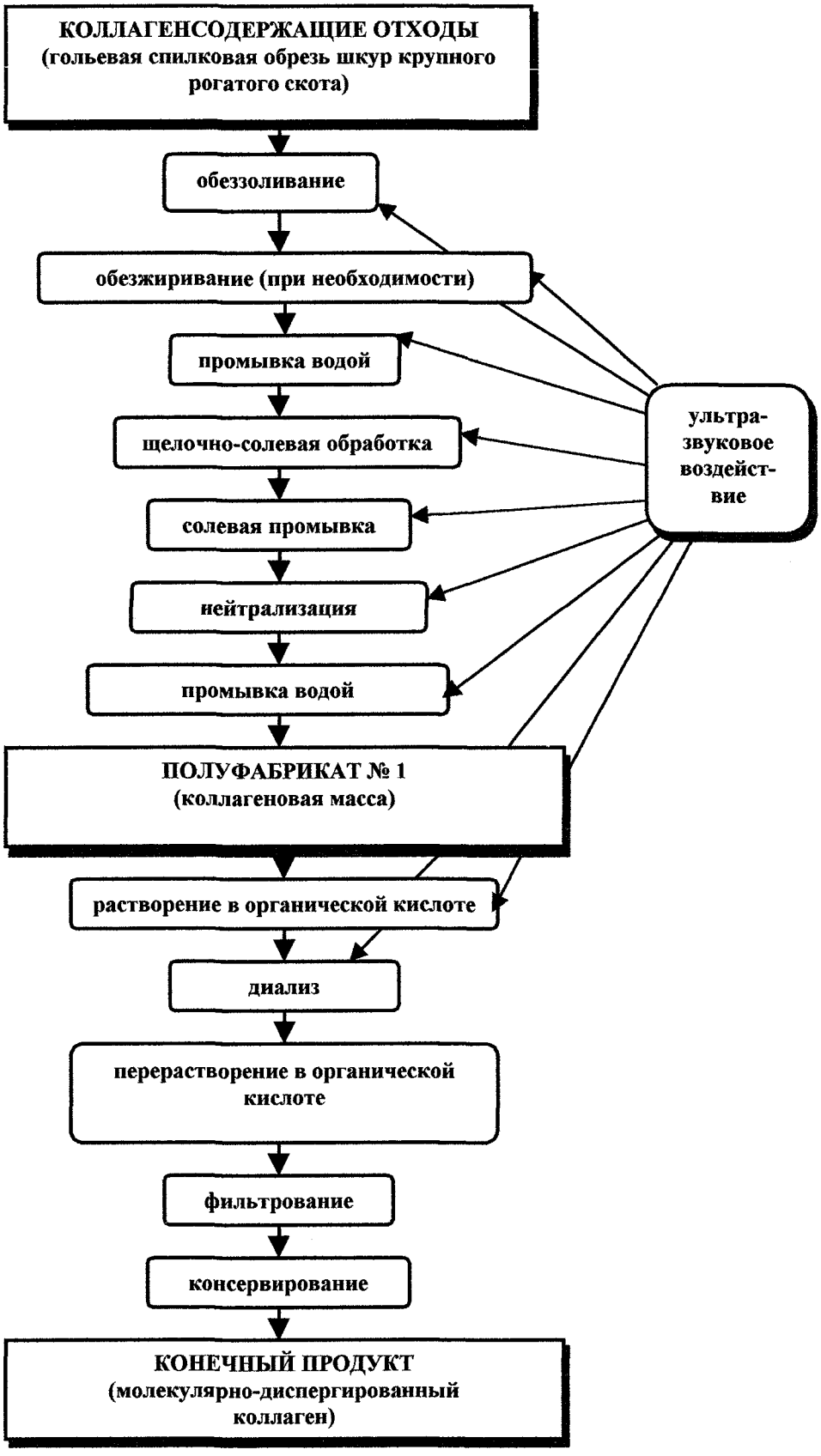


Рис.17. Универсальная технологическая схема получения коллагена из белоксодержащих отходов сырья животного происхождения

($C_2H_4O_2$) или лимонной ($C_6H_8O_7$) и т.д. Это обусловлено тем, что аскорбиновая кислота, как известно, способствующая повышению общей резистентности организма (99), лимонная кислота дает отбеливающий эффект и хороша для кремов, уксусная кислота эффективна в изделиях, предназначенных для ополаскивания волос (18) и т.д.

Коллагеновый золь, полученный по разработанному нами способу, в отличие от золя, полученного по стандартной технологии, практически не содержит посторонних белков, углеводных компонентов, жировых веществ и на 1,67 % меньше содержит минеральных веществ. При использовании рекомендуемых нами режимов выход белка увеличивается до 91,7- 92,4 % (табл.34).

Таблица 34

Химический состав коллагенового золя, полученного разными способами из отходов спилка свиных шкур, прошедших золение

Коллагеновый золь, полученный по:	Содержание, % от абсолютно сухого вещества				
	коллагена	неколлагеновых белков	углеводных компонентов	жировых веществ	минеральных веществ
- А.С. №162280 СССР	92,09±1,05	1,56±0,08	0,85±0,05	2,99±0,13	1,71±0,09
- патенту № 2031597 РФ	98,70±1,16	—	0,06±0,003	—	0,040±0,003

Несмотря на то, что разработанный нами способ получения коллагенового золя позволил осуществлять наработку целевого продукта, имеющего более высокие показатели качества, чем у аналогичных препаратов, выпускаемых рядом иностранных фирм, следует отметить, что и этот метод не лишен определенных недостатков, в частности, он не достаточно снижает уровень загрязнения сточных вод. Кроме того, полный технологический цикл составляет 7—8 дней, а использование ультразвука, хотя и сокращает время обработки, в то же время удорожает производство.

В этой связи поиск альтернативного щелочно-солевому более экологически чистого способа предварительной подготовки коллагенсодержащего сырья к растворению, приобретает особую актуальность в соответствии с требо-

ваниями времени.

Недавно появившаяся технология пероксидно-щелочной обработки кожевенного сырья в процессе его обезволашивания — золения, а также наши собственные исследования по использованию пероксида водорода в составе щелочных и кислотных композиций при получении имитаторов ткани на основе нерастворимого коллагена открывают новый подход к получению растворов коллагена.

Целесообразность такого подхода заключается в том, что дает возможность исключить загрязнение сточных вод сульфатами, а также ускорить процесс наработки коллагена, не снижая степени чистоты готового продукта.

Как известно (98), набухание коллагена в щелочной среде происходит за счет усиленной гидратации и электростатического отталкивания одновременно заряженных ионов в структуре белка. Устранить его можно не только добавлением нейтральных солей типа сульфатов, как это имеет место при щелочно-солевой обработке, но и с помощью пероксида водорода.

В результате его каталитического разложения выделяется атомарный кислород, который как сильный окислитель, вступает во взаимодействие с активными группами боковых цепей коллагена, образуя радикалы, способные взаимодействовать друг с другом.

Однако, наряду с этим, возможен и другой механизм действия пероксида водорода на структуру сырья. Он заключается в том, что пероксид водорода разлагаясь, значительно повышает внутрипоровое давление в соединительной ткани, раздвигает ее структурные элементы и, тем самым, усиливает разрыхляющее действие щелочи.

Очевидно, эти два процесса происходят параллельно и зависят от соотношения щелочи и пероксида водорода в реакционной смеси. При химической обработке сырья в растворе, содержащем гидроксид натрия и пероксид водорода, в результате взаимодействия этих двух компонентов происходит экзотермическая реакция, которая интенсифицирует процесс очистки фибриллярного коллагена за счет ускорения разрыва водородных связей.

На начальном этапе исследования в работе использовали пероксидно-щелочные растворы, содержащие 10 % щелочи и разные количества пероксида водорода.

Результаты опытов по подбору оптимального соотношения компонентов в пероксидно-щелочных смесях представлены на рис. 18-19.

Как видно из рис. 18, процесс поглощения щелочи гольевой спилковой обрезью происходит весьма интенсивно в первые 6—12 часов после начала обработки. Первоначальное уменьшение концентрации щелочи в рабочих растворах объясняется, по-видимому, диффузией ионов гидроксила из рабочего раствора внутрь структуры гольевой спилковой обрези. В дальнейшем концентрация щелочи в рабочих растворах снижается незначительно и остается примерно на одном уровне в каждом из вариантов, за счет неравномерной сорбции и десорбции гидроксида натрия.

Большое влияние этот процесс оказывает пероксид водорода (рис. 19). Как свидетельствуют результаты наших опытов, в определенных концентрациях он может препятствовать проникновению щелочи в структуру белка. Так, например, при добавлении в реакционную смесь 2,5 % пероксида водорода образец может максимально поглотить до 53,5 % щелочи от ее первоначального количества. При этом количество пероксида водорода в рабочем растворе уменьшается с 26,1 г/л до 12,2 г/л. Тем не менее, образцы сырья, подвергнутые обработке по варианту **1** набухали незначительно. Очевидно, что если пероксида водорода в четыре раза меньше, чем щелочи, то этого недостаточно, чтобы усилить ее разрыхляющее действие. При соотношении щелочи и пероксида водорода 3:1 (вариант **2**), процесс проникновения щелочи в образец происходит более интенсивно. Через 48 часов после начала опыта, образцы сырья поглощают до 65 % щелочи и до 60 % пероксида водорода. Это ведет к сильному набуханию образца. При использовании третьего варианта обработки (при соотношении компонентов 2:1) было установлено, что процесс поглощения щелочи образцом из растворов замедляется. Так, например, концентрация щелочи в рабочих растворах через 6 часов после начала обработки

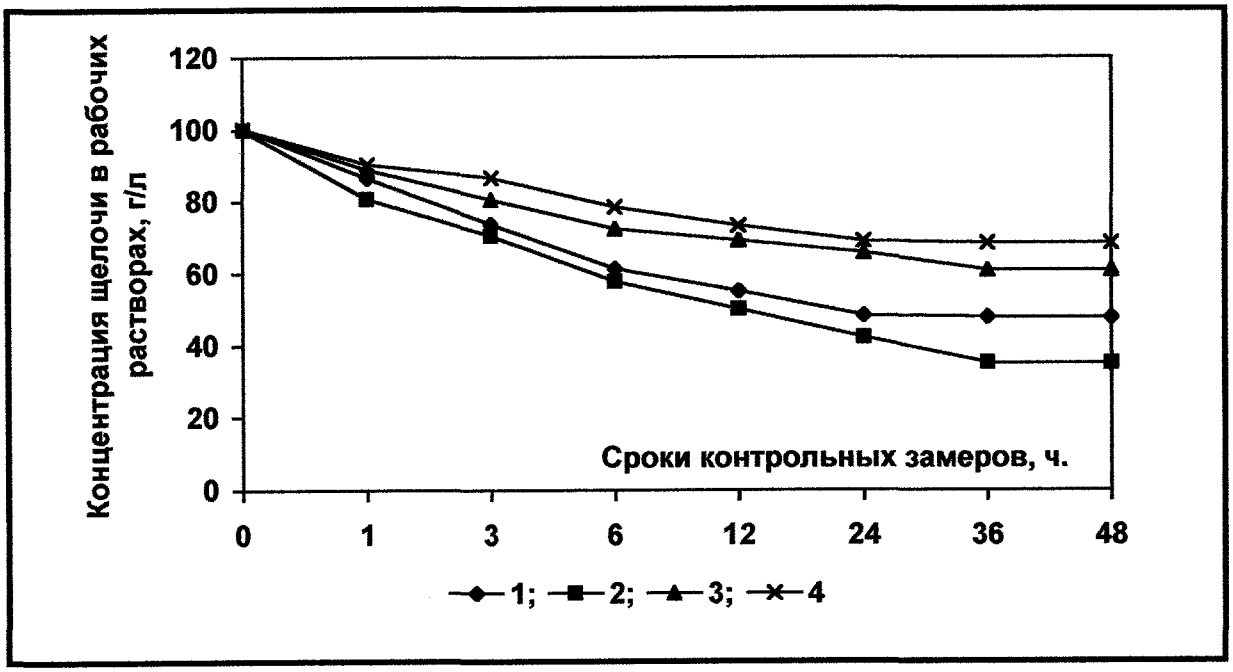


Рис. 18. Динамика изменения содержания щелочи в рабочих растворах в процессе пероксидно-щелочной обработки гольевой спилковой обрези шкур крупного рогатого скота (при концентрации пероксида водорода: 1-2,5%, 2-3%, 3- 5%, 4-10%)

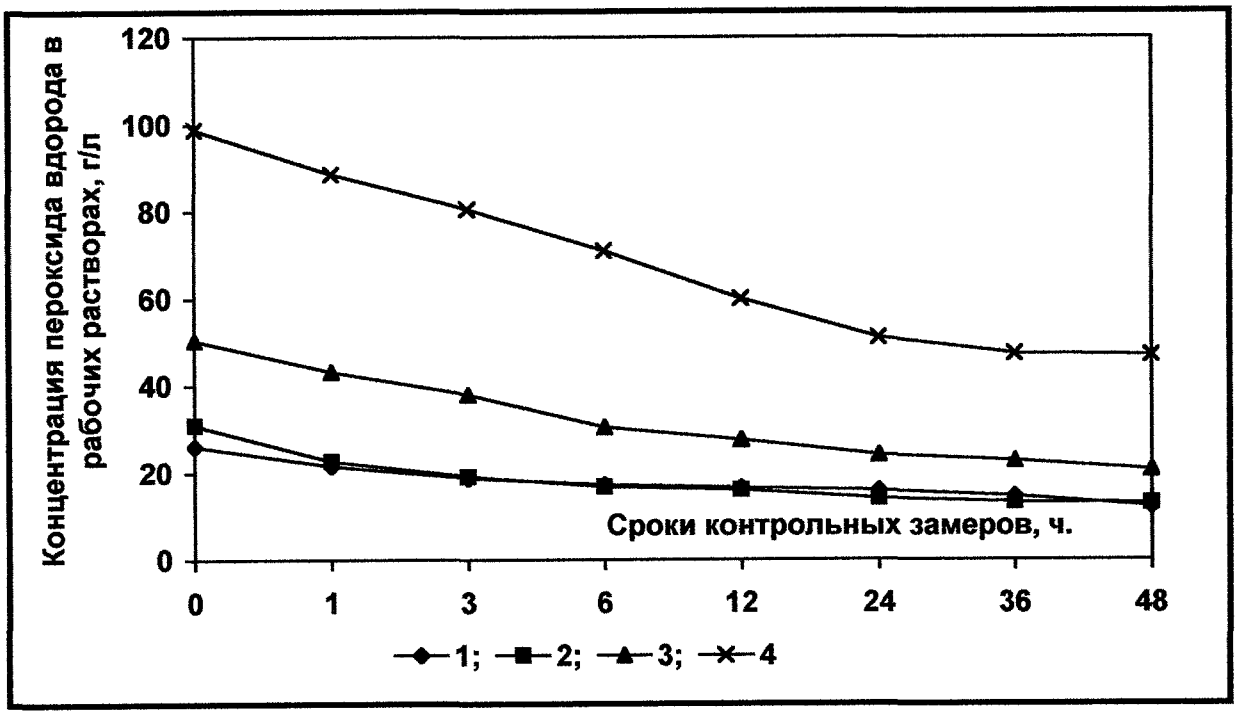


Рис. 19. Динамика изменения содержания пероксида водорода в рабочих растворах в процессе обработки гольевой спилковой обрези шкур крупного рогатого скота (при концентрации пероксида водорода: 1-2,5%, 2-3,0%, 3- 5,0%, 4-10,0%)

составляет 72,4 г/л, что на 14,4 % выше, чем при втором варианте обработки через тот же промежуток времени. Через 48 часов эта разница составляет уже 25,8 %. Что касается пероксида водорода, то при варианте **3** обработки через 48 часов содержание его в исследуемых образцах составляет 59,5 % от исходного количества пероксида водорода в рабочем растворе. Полученные данные свидетельствуют о том, что количество пероксида водорода, проникшего в структуру образца, выше процента адсорбировавшейся там щелочи.

Полученные результаты подтверждают гипотезу о том, что избыток пероксида водорода вызывает образование дополнительных связей в структуре образца и препятствует проникновению в него щелочи. Такой эффект возникает при соотношении щелочи и пероксида водорода в рабочем растворе 2:1.

Изменение этого соотношения на 1:1 (вариант **4**) еще более замедляет процесс проникновения щелочи в образец. В данном случае образец способен поглотить всего 31,7 % щелочи из рабочего раствора и более 50 % пероксида водорода. В результате он становится очень жестким, происходит значительное уплотнение структуры голья.

Очевидно, пероксид водорода в использованных в данном варианте обработки концентрациях, вызывает образование множественных связей радикального типа между активными группами боковых цепей молекул коллагена в соединительной ткани. Последующие нейтрализация, промывка и растворение в 1М уксусной кислоте образцов, обработанных по четырем вариантам, показали, что образец № 1 хорошо набухал в уксусной кислоте, но до конца не растворялся, образец № 2 растворялся полностью, а образцы № 3 и № 4 растворить было невозможно.

Таким образом, проведенные эксперименты позволили подобрать такое соотношение щелочи и пероксида, при котором достигается эффект максимального разрыхления структуры гольевой спилковой обрези, что способствует очистке коллагена от сопутствующих биополимеров и облегчает его последующее растворение в слабых органических кислотах.

В дальнейшем было показано, что при данном способе обработки осново-

полагающее значение имеет именно соотношение реагентов, а их концентрация влияет лишь на продолжительность процесса.

Для подтверждения правильности выбора оптимального соотношения щелочи и пероксида водорода по окончании пероксидно-щелочной обработки был проведен анализ рабочих растворов на присутствие в них продуктов гидролитического расщепления белков и полисахаридов (табл.35).

Таблица 35

Содержание некоторых специфических белковых и углеводных компонентов в рабочих растворах после пероксидно-щелочной обработки

Вариант обработки	Концентрация компонентов, г/л (средние значения, n=3)				
	оксипролин	тирозин	гексозы	гексозамины	уроновые кислоты
I	0,016	0,045	0,423	0,103	0,095
II	0,020	0,055	0,442	0,153	0,109
III	0,015	0,031	0,361	0,088	0,080
IV	0,011	0,025	0,297	0,065	0,069

Как видно из таблицы, при всех вариантах обработки в рабочих растворах можно обнаружить следовые количества оксипролина. Это свидетельствует о том, что под действием щелочи, вероятно, от фибрилл коллагена III типа, в незначительном количестве присутствующих в дерме наряду с коллагеном I типа, отщепляются низкомолекулярные пептиды, содержащие эту аминокислоту. При этом структура коллагеновых волокон I типа изменений не претерпевает и возможность потери коллагена в процессе пероксидно-щелочной обработки исключается. Наличие в отработанных растворах тирозина, гексоз, гексозаминов и уроновых кислот, подтверждают тот факт, что в процессе пероксидно-щелочной обработки они вымываются из соединительной ткани. При соотношении пероксида водорода и щелочи 1:3 их удаляется больше, чем при других вариантах обработки. Это подтверждают ранее полученные данные, что при втором варианте обработки, происходит наиболее полная очистка коллагеновых структур от сопутствующих биополимеров.

Сравнительная оценка химического состава физико-химических параметров коллагенового золя, полученного пероксидно-щелочным и щелочно-

солевым методами из гольевой спилковой обрези шкур крупного рогатого скота (табл.36) свидетельствует, что по таким показателям как дисперсность, степень очистки, процент выхода белка коллаген, полученный пероксидно-щелочным методом, не уступает, а в ряде случаев и превосходит коллаген, полученный по щелочно-солевой методике.

Таблица 36

Физико-химические параметры коллагеновых золей, полученных разными способами из отходов спилка шкур крупного рогатого скота

Коллагеновый золь	Средневзвешенный радиус коллагеновых частиц, нм	Содержание, % от абсолютно сухого вещества			Выход белка
		коллагена	углеводных компонентов	минеральных веществ	
- по патенту №2031597 РФ	72,0	98,7±1,16	0,06±0,03	0,04±0,003	92,1
- по патенту № 2129805 РФ	53,0	99,2±0,7	0,04±0,03	0,02±0,002	93,2

Обобщая результаты проведенных исследований, следует отметить, что использование пероксидно-щелочного способа предварительной подготовки коллагенсодержащего сырья к растворению позволяет полностью отказаться от применения сульфата натрия, негативно влияющего на окружающую среду. Вследствие этого для нейтрализации отработанных растворов требуется значительно меньше реактивов. Кроме того, продолжительность технологического цикла по предлагаемому способу сокращается примерно в 2 раза за счет исключения таких операций как обеззоливание, солевая промывка, диализ. Новый более экономичный и экологически чистый способ получения коллагенового золя защищен патентом Российской Федерации приоритетом от 30.12. 97г. Технологическая схема усовершенствованного способа получения коллагенового золя представлена на рис.20.

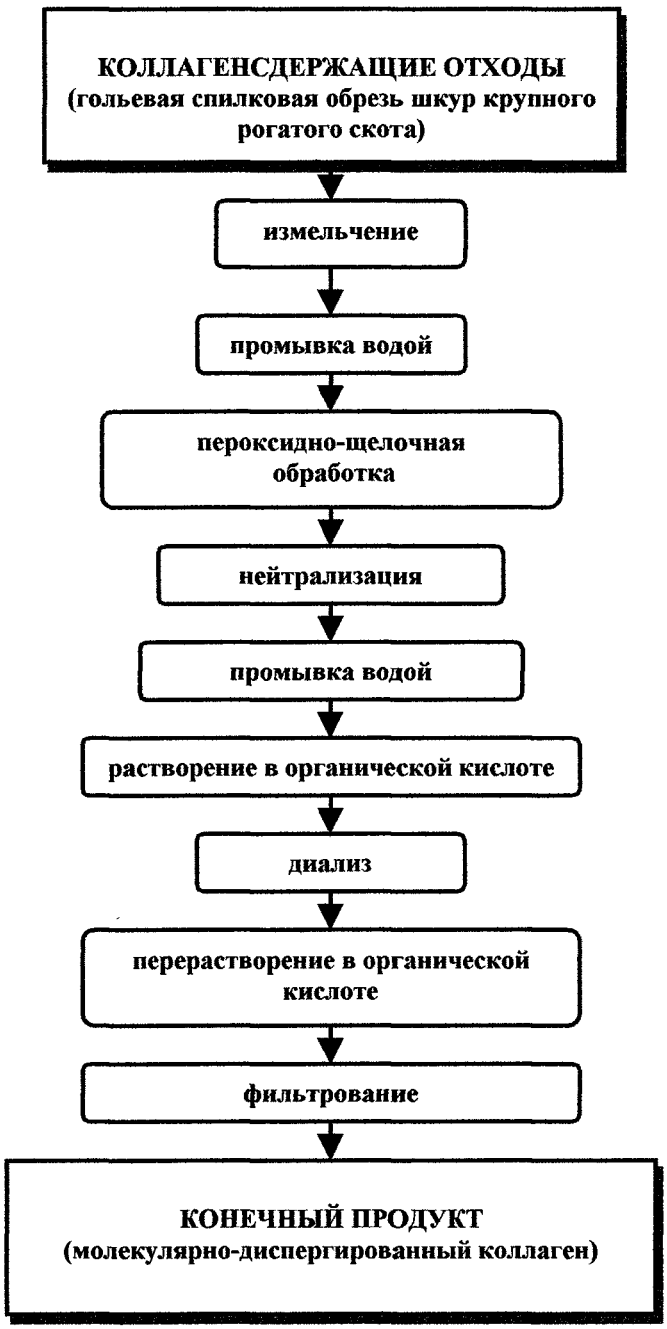


Рис. 20. Технологическая схема получения коллазоля пероксидно-щелочным способом

4.2. Эластин

4.2.1.Разработка способа получения раствора молекулярно-диспергированного эластина

Преимущества пероксидно-щелочного метода предварительной обработки коллагенсодержащих тканей послужили основанием для изучения возможностей его использования для выделения эластина из соединительнотканных образований. Этот белок в силу своего строения и структурных особенностей устойчив к действию различных химических реагентов и выделить его общепринятыми методами невозможно (156, 158). Известно (108, 235), что в экстрацеллюлярном веществе соединительной ткани «зрелый» эластин находится в виде высокомолекулярных агрегатов фибриллярного типа, связанных между собой редкими межмолекулярными связями и образующих разветвленную сетчатую структуру с низкой степенью упорядоченности, тесно связанную с другими биополимерами — коллагеном, протеогликанами, глико- и мукопротеинами посредством ковалентных поперечных связей.

Учитывая этот факт, что эластин не растворим при нагревании до 100 °С в денатурирующих реактивах, разрывающих водородные связи, неэластиновые компоненты удаляли из эластинсодержащего исходного сырья путем его термохимической обработки с помощью автоклавирования или кипячения в воде и в водных растворах гидроксида натрия. Результаты эксперимента представлены в табл.37.

Кипячение выйной связки в воде и водных растворах гидроксида натрия ведет к разрыхлению структуры сырья и, как следствие этого, к разрушению биополимеров, присутствующих наряду с эластином в выйной связке. Следует отметить, что щелочь оказывает более сильное действие, чем вода. В этом случае деструкция всех сопутствующих эластину белков соединительной ткани, омыление жиров, ослабление связей в микроструктуре самого эластина происходят гораздо интенсивнее. Так, например, уже через сутки после кипячения выйной связки в 0,1 н. растворе щелочи, она максимально размягчается, а в рабочих растворах уже не удается обнаружить белок. Увеличение

Таблица 37

Изменение состояния сырья и рабочих растворов в процессе термохимической обработки выйной связки

Вариант обработки	Состояние исходного сырья (А) и наличие белка в рабочих растворах (Б)									
	Время обработки, час.									
	6		12		24		32		48	
	А	Б	А	Б	А	Б	А	Б	А	Б
Вода	1	+	1	+	2	+	3	-	3	-
0,5н NaOH	1	+	1	+	2	+	3	+	4	-
0,1н NaOH	2	+	3	+	5	-	5	-	5	-
0,15н NaOH	2	+	4	+	5	-	5	-	5	-

Примечание: состояние сырья оценивали по степени его размягчения, от более твердого к мягкому и желеобразному, в баллах; наличие белка в рабочих растворах оценивали по биуретовой реакции: «+» — присутствие белка, «-» — отсутствие его.

концентрации щелочи не оказывает существенного влияния на этот процесс.

В результате, после зачистки и промывки водой, остается нерастворимый, потерявший прочность материал, адсорбировавший воду.

Для перевода очищенного от балластных веществ фибриллярного эластина в растворенного состояние использовали пероксидно-щелочное воздействие. Обработка смесью гидроксида натрия и пероксида водорода ведет к дальнейшему набуханию, дестабилизации поперечных связей, т.е. происходит еще более глубокое нарушение надмолекулярной структуры белка. Варьируя пропорции основных реагентов можно взаимно усилить механизм действия каждого из них и выбрать оптимальный вариант обработки (табл.38).

Как видно из представленных данных, при обработке фибриллярного эластина по первым двум вариантам в растворенное состояние можно перевести 78,6 % и 96,2 % белка, соответственно. Обработка по третьему варианту дает результат, аналогичный второму варианту. При повышении концентрации реагентов до 4 %, выход нативного белка резко сокращается за счет его перерастворения до пептидных «осколков».

Получаемый после пероксидно-щелочной обработки полуфабрикат представляет собой гомогенную вязкую массу. С целью доведения растворимого

Таблица 38

Выход растворенного белка при пероксидно-щелочной обработке фибриллярного эластина

Вариант обработки	Масса образца, г	Содержание белковых веществ в сухом остатке, г	Жидкостный коэффициент	Объем раствора эластина, мл	Содержание белка в сухом остатке раствора, г	Выход белка, %
1% H_2O_2+ 1% NaOH	100	29,1	3	400	22,8	78,6
2% H_2O_2+ 2% NaOH	100	29,2	3	400	28,1	96,2
3% H_2O_2+ 3% NaOH	100	28,9	3	400	27,9	96,5
4% H_2O_2+ 4% NaOH	100	20,0	3	400	13,9	44,8

эластина до состояния, отвечающего требованиям, предъявляемым к белковым косметическим полупродуктам, его подвергали очистке от низкомолекулярных примесей путем осаждения в кислой среде при pH 4,5—5,5 и промывки, а затем перерастворяли, повышая pH до 6,5—7,5, после чего проводили гомогенизацию и фильтрование продукта.

Совокупность использованных технологических приемов позволила получить целевой продукт, представляющий собой высокомолекулярную фракцию, сохраняющую все свойства нативного, солюбилизированного до макромолекул и их ассоциатов эластина (рис.21), называемую α–эластином, в частности, способность к осаждению трихлоруксусной кислотой (158) и имею щую, как считает ряд авторов (311, 395), молекулярную массу 60—84 тыс.

Рис. 21. Внешний вид высокомолекулярного эластина

Подтверждением выше изложенному служат данные биохимического контроля изменений, происходящих с исходным сырьем в процессе получения солюбилизированного эластина (табл.39).

Технологическая схема получения солюбилизированного эластина представлена на рис.22.

4.3 Кератин

Существующие способы переработки малоценного кератинсодержащего сырья и отходов с целью получения кератина основаны, главным образом, на полном гидролитическом расщеплении их кислотами, щелочами, ферментами, а также водой при повышенной температуре и давлении (290).

Подобный методический подход ведет к потере свойств, присущих нативному белку, что значительно сужает область практического применения кератина. Некоторые из предлагаемых технологий требует применения дорогостоящих, не всегда экологически безопасных реактивов (167, 176, 373, 411), имеют ряд других недостатков.

Ставя своей целью интенсификацию и удешевление способа получения кератина, повышение процента выхода и качества конечного продукта, мы провели ряд экспериментов, направленных на солюбилизацию этого фибриллярного белка до уровня макромолекул и их ассоциатов. Также были изучены изменения, происходящие с исходным сырьем при различных химических обработках.

4.3.1.Разработка способа получения раствора молекулярно-диспергированного кератина

В основу предлагаемой нами технологической схемы получения растворов кератина положен метод постадийного воздействия на кератинсодержащий материал (волос или шерстяное волокно) (рис.24) окислительными смесями кислотного и щелочного характера.

Обработка сырья реакционной смесью, состоящей из муравьиной кислоты и пероксида водорода в оптимально подобранном соотношении, существенно ослабляет солевое взаимодействие между кератином фибрилл и меж-

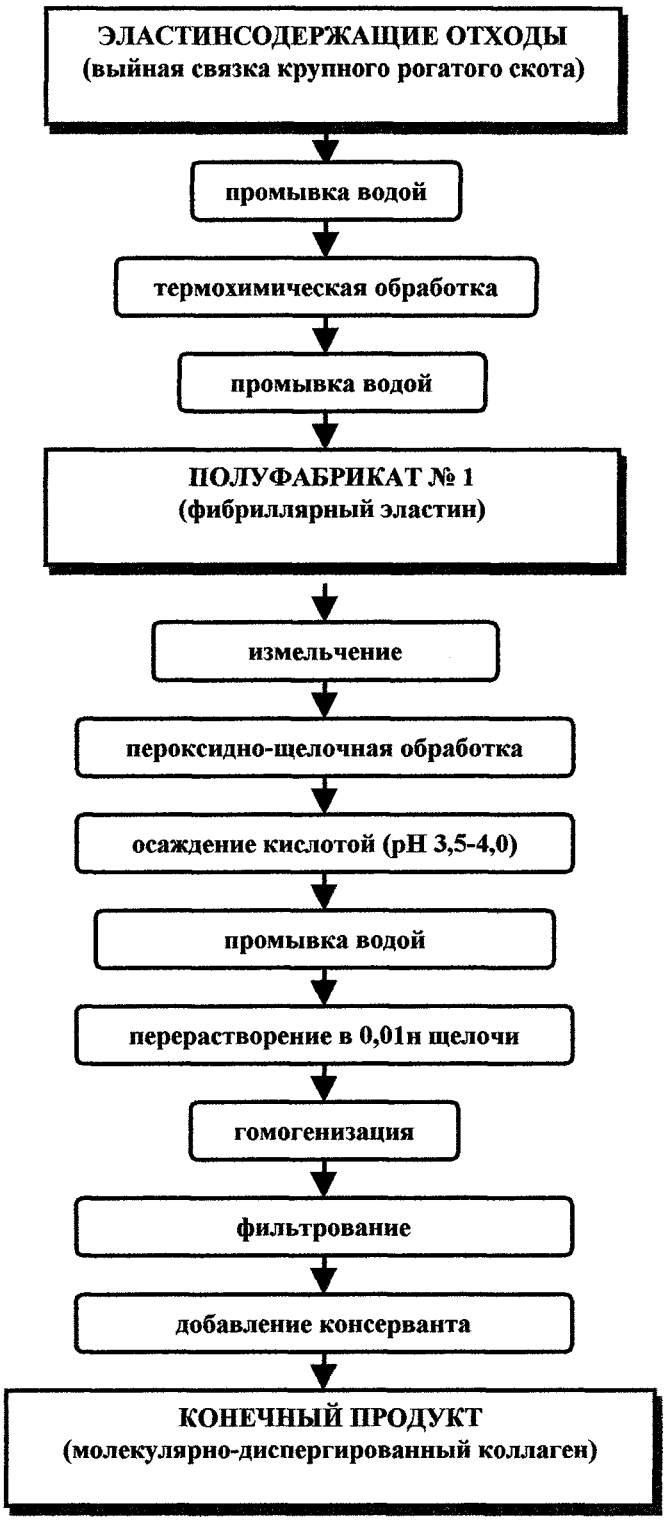


Рис. 22. Технологическая схема получения препарата эластина

Таблица 39

Сравнительная характеристика химического состава исходного сырья, полуфабриката и целевого продукта на отдельных этапах получения растворенного эластина

Объект исследования	Содержание, % от абсолютно сухого вещества							
	минеральные вещества	жировые вещества	белковые вещества	коллаген	неколлагеновые белки	углеводные компоненты		
						гексозы	гексозамины	уроновые кислоты
Выйная связка (исходное сырье)	0,62±0.016	1,35±0,11	92,8±0,51	6.79±0,06	10,23±0,04	1,15±0,009	следы	4,06±0,02
Полуфабрикат I (после термохимической обработки)	0,68±0,015	0,78±0,05	96,14±0,83	—	5,33±0,06	0,46±0,005	следы	1,43±0,01
Полуфабрикат II (после пероксидно-щелочной обработки)	0,55±0,01	0,35±0,005	98,0±0,54	—	1,8±0.002	0,20±0,002	—	0,43±0,001
Целевой продукт (солюбилизированный эластин)	0,27±0,01	0,30±0,002	99,05±0,70	—	—	0,2±0,003	—	0,29±0,002

фибриллярного вещества, нарушает систему водородных связей, вызывает гидролиз некоторой части пептидных связей.

Рис. 23.
Овечий волос до обработки (световая микроскопия, увеличение 800)

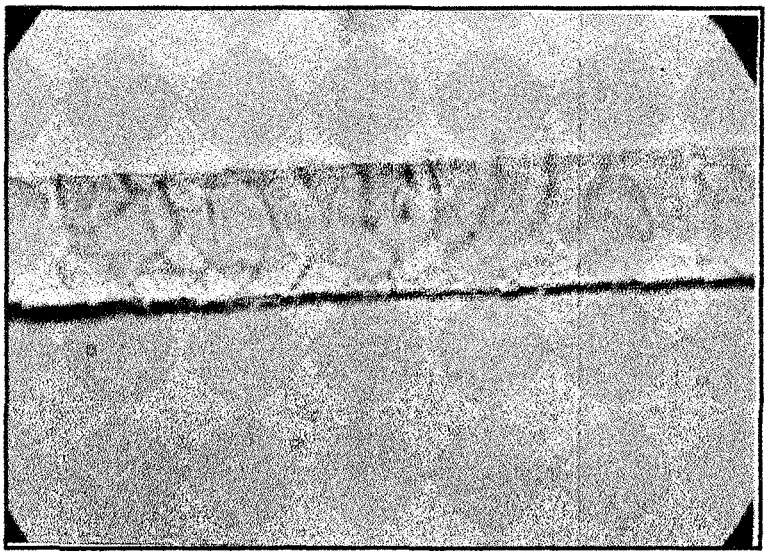
Окисление дисульфидных связей, сопровождается образованием производных цистеиновой кислоты, и, следовательно, увеличением в белке содержания функциональных групп кислотного характера. В связи с тем, что кератин цементирующего вещества химически более активен, чем кератин фибрилл, окисление серосодержащих групп на этом этапе растворения происходит преимущественно в этом веществе. Это приводит к снижению катионной активности кератинов цементирующего вещества и к изменению ионного взаимодействия с кератинами фибрилл. Окисление дисульфидных связей является начальным процессом дестабилизации структуры белка и значительно облегчает его дальнейшую деструкцию посредством разрушения межфибриллярных пептидных связей, т.к. этот процесс значительно легче и интенсивнее протекает по месту пептидных связей, смежных с остатками цистеиновой кислоты (106).

Все это химически подготавливает кератинсодержащий материал к последующему пероксидно-щелочному воздействию, увеличивая его растворимость в щелочной среде за счет предварительного разрушения некоторого количества пептидных и дисульфидных связей.

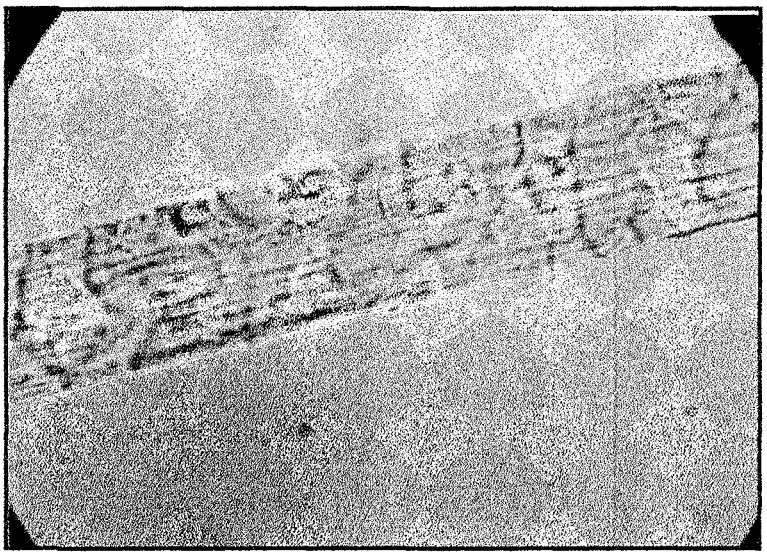
Описанные выше деструктивные изменения внешне выражаются в край-

не незначительном утолщении, например, шерстяного волокна и отслоении отдельных клеток кутикулы (рис. 24).

Эту фазу, когда отсутствуют четко видимые изменения в структуре, можно условно назвать фазой покоя, хотя именно в этот период кислота и пероксид водорода постепенно проникают в кутикулу, а затем и в цементирующее вещество кортекса, за счет чего и происходит ослабление структурного взаимодействия между отдельными компонентами волокна.



а



б

Рис. 24. Изменение структуры шерстного волокна под влиянием кислотно-пероксидной обработки: а – через 2 часа, б – через 9 часов (световая микроскопия, увеличение 800)

На длительность этой фазы может влиять толщина, прочность, пористость кутикулы и кортекса, наличие или отсутствие потожировых отложений.

Последующая промывка водой удаляет кислоту и пероксид водорода (рис.25).

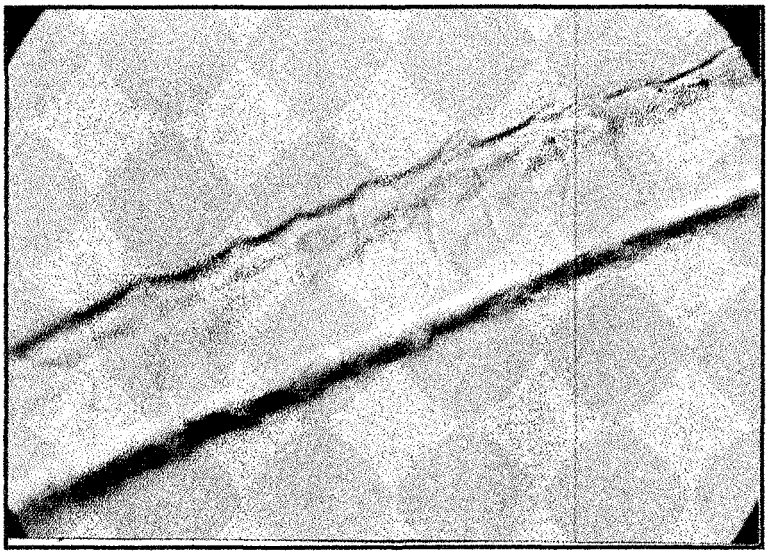


Рис.25.
Изменение структуры шерстного волокна после промывки водой (pH – 6,5)

Дальнейшее расщепление волокон происходит под действием смеси гидроксида натрия и пероксида водорода. Щелочной окислительный раствор более энергично действует на волос, чем кислотная окислительная смесь. Обработка такой реакционной смесью ведет к дальнейшему ступенчатому гидролитическому разрушению остатков дикарбоновых кислот, перестройке водородных и разрушению солевых связей, к разрыву в начале в чешуйчатом, а затем в корковом слое, следствием чего является образование цистина и производных сульфеновых групп.

При этом под действием щелочи образуются сульфеновые кислоты: R_1-S-S-R_2 + H_2O ---> R_1-S-OH + R_2-SH, которые в силу своей неустойчивости разрушаются или с выделением сероводорода и образованием в белке альдегидных групп:

$$R\text{-}CH_2\text{-}S\text{-}OH \rightarrow R\text{-}CH{=}S\text{-}H \rightarrow R\text{-}\overset{\displaystyle O}{\overset{\displaystyle \|}{C}}\text{-}H + H_2S,$$

или с выделением серы и образованием веществ, содержащих ОН-группы:

$R\text{-}CH_2\text{-}S\text{-}OH \rightarrow R\text{-}CH_2\text{-}OH + S$

Окислительное воздействие перекиси водорода направлено на различные функциональные группы и связи в кератине (особенно дисульфидные и пептидные, а также тирозиновые остатки. Если он действует на дисульфидную связь, то вначале происходит гидролиз, а затем окисление сульфгидрила и сульфеновых кислот под влиянием атомарного кислорода:

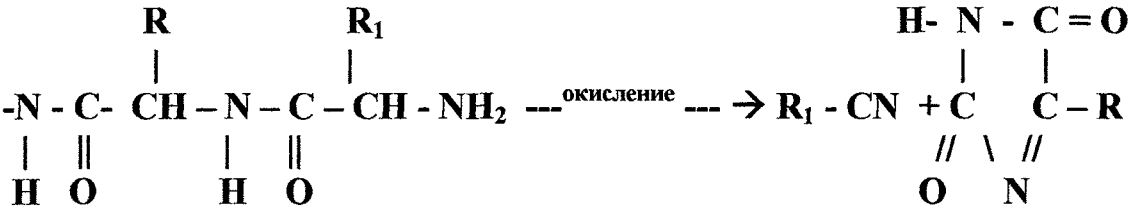
$R\text{-}S\text{-}\ S\text{-}R_1 \xrightarrow{\text{гидролиз}} R\text{-}SH\ \ R\text{-}S\text{-} + R_1\text{-}S\text{-}OH \xrightarrow{\text{окисление}} R\text{-}SO_2H \xrightarrow{\text{окисление}} R\text{-}SO_3OH.$

Но может иметь место окисление и без разрыва дисульфидной связи:

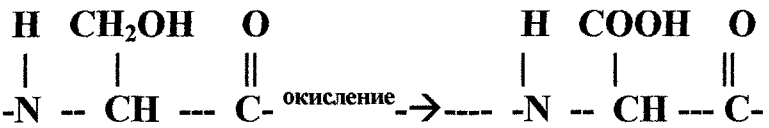
$R\text{-}S\text{-}S\text{-}R_1 \xrightarrow{\text{окисление}} R\text{-}SO\text{-}S\text{-}R_1 \xrightarrow{\text{окисление}} R\text{-}SO\text{-}SO\text{-}R_1 \xrightarrow{\text{окисление}}$

$\rightarrow R\text{-}SO_2\text{-}SO\text{-}R_1 \xrightarrow{\text{окисление}} R\text{-}SO_2\text{-}SO_2\text{-}R_1$

или дегидрогенизация групп -NH-CH-R с образованием гидантоиновых колец:



Могут окисляться остатки аминокислот, например серина:



Увеличение содержания функциональных групп кислотного характера, главным образом, в межфибриллярных кератинах, ослабляет ионное взаимодействие между отдельными морфологическими компонентами волоса, внутри них и, в конечном итоге, между отдельными макромолекулами.

На заключительном этапе растворения происходит усиленное (обвальное) нарушение системы водородных и солевых связей в кератинах фибрилл, гидролизуются амиды аминокислотных остатков и разрушаются пептидные связи между макромолекулами белка.

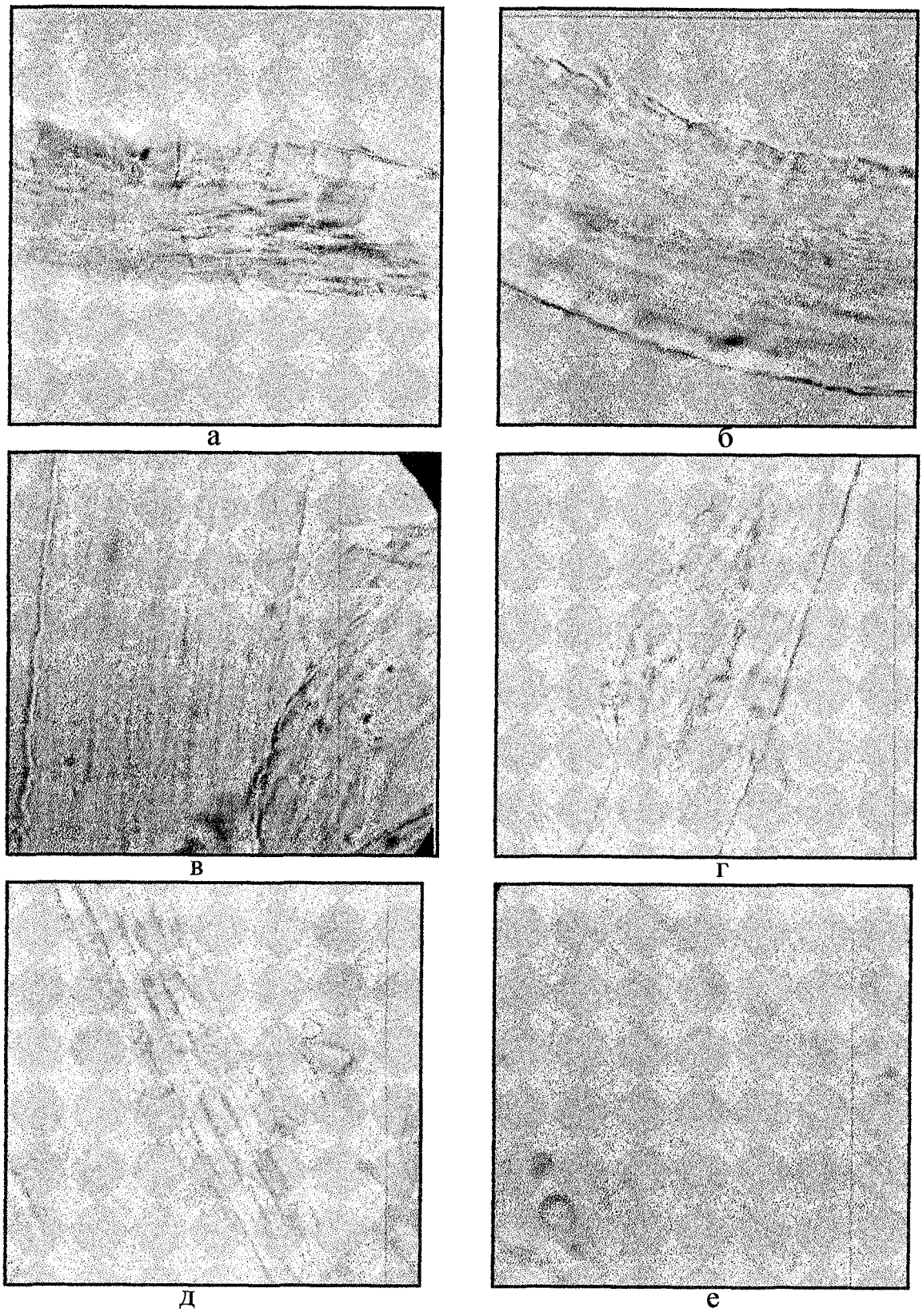


Рис. 26. Изменение структуры шерстного волокна под влиянием пероксидно-щелочной обработки:
а – через 2 часа, б – 12 часов, в – 16 часов, г- 20часов, д – 24 часа,
е – раствор (световая микроскопия, увеличение 800)

Полученный полуфабрикат содержит в своем составе нативный кератин в виде макромолекул, их ассоциатов, а также в небольшом количестве продукты полного гидролиза белка и минеральные вещества.

Добавление пероксидно-щелочной смеси к химически подготовленному волокну ведет к более резкому изменению размеров кутикулярного и коркового слоя (рис.26,а). Происходит отщепление клеток кутикулы, край волокна при этом становится как бы бахромчатым (рис. 26,б), затем она начинает растворяться, выходят пузырьки воздуха, появляются разрывы в корковом веществе вдоль волокна (рис. 26, г) и, в конечном итоге, наступает полное растворение волокна.

Сочетание гидролитических и окислительных реакций способствует максимальному обводнению волоса, более целенаправленному и интенсивному разрушению связей между кератином и сопутствующими ему веществами из межфибриллярного матрикса (жиром, пигментами, углеводно-белковыми компонентами некератиновой природы, в том числе и тирозинсодержащими белками). Подкисление пероксидно-щелочной смеси до pH 4,0 позволило нам провести фракционирование белков волоса, т.к. известно (158), что при таких значениях pH происходит структурирование фибриллярного кератина за счет частичного восстановления дисульфидных связей и, вследствие этого, выпадение его в осадок в отличие от компонентов межфибриллярного матрикса, остающихся в растворе. Получить очищенный от балластных веществ и низкомолекулярных примесей полуфабрикат фибриллярного кератина можно с помощью промывки вначале проточной водой, а затем диализа.

Следует отметить, что мягкая щелочная обработка осажденного фибриллярного кератина посредством увеличения pH реакционной смеси до 6,5-7,5, использованная на конечном этапе процесса с целью растворения кератина и завершающая ступенчатую деструктурирующую модификацию исходного сырья, направленную на разрушение существующей в волосе системы связей, освобождает полипептидные цепочки кератинов от структурной связанности не только в поперечном, но и продольном направлениях и дает возможность полу-

чить белковую субстанцию в виде макромолекул и их ассоциатов.

Совокупность описанных выше технологических приемов была использована для получения растворимых форм кератина из проанализированных ранее (табл.21) кератинсодержащих отходов.

Следует отметить, что гистоструктурные особенности сырья оказывают определенное влияние на его обводняемость и процесс выхода конечного продукта при одинаковых температурно-временных режимах и концентрациях реагентов в рабочих растворах.

Так, например, при проведении кислотно-пероксидной обработки достичь полного обводнения оленьего волоса можно лишь при жидкостном коэффициенте (ж.к.) равном 60, тогда как для волоса крупного рогатого скота и щетины этот показатель равен 20 и 25 соответственно, а для тонкого гребенного очеса - 18. При проведении пероксидно-щелочной обработки ж.к. для всех перечисленных выше видов отходов составляет 25, 12, 15 и 10, соответственно.

Что касается процента выхода нативного растворимого кератина, то значение этого показателя наибольшее для шерстяного очеса и составляет 68,1 %. Вероятно, это обусловлено отсутствием сердцевины в шерстном волокне и оптимально подобранными режимами растворения. Выход растворимой фракции фибриллярного кератина из волоса крупного рогатого скота и щетины-шпарки составляет 57,9 % и 53,5 % соответственно, из волоса северного оленя - 39,4 %. Снижение выхода белка, в последнем случае обусловлено, вероятно, тем, что для данного вида исходного сырья соотношение щелочи и пероксида водорода в рабочем растворе не является оптимальным.

Очевидно, атомарный кислород, который выделяется в результате каталитического разложения перекиси, как сильный окислитель вступает во взаимодействие с активными группами цепей кератина, образуя радикалы, способные взаимодействовать друг с другом, т.е. имеет место эффект "сшивки" и выход нативного фибриллярного кератина уменьшается.

В целом полученные результаты соответствуют данным о том, что на долю фибриллярного кератина приходится в среднем 60 % от основной массы воло-

са и шерсти (158).

Растворы фибриллярного кератина, полученные из различных видов кератинсодержащих отходов довольно близки по химическому составу (табл. 40).

Таблица 40

Сравнительная характеристика химического состава растворимой фракции фибриллярного кератина из различных видов кератинсодержащих отходов

Растворимая фракция фибриллярного кератина получена из:	Жидкостной коэффициент на стадии обработки:		Выход белка, %	Влага, %	Содержание, % от абсолютно сухого вещества (средние значения, n=5)		
	кислотно-пероксидной	пероксидно-щелочной			зола	жир	белок
волоса северного оленя	60	25	39,4	94,87	1,43	0,05	90,84
волоса крупного рогатого скота	20	12	57,9	95,18	1,19	1,82	95,93
щетины	25	15	53,5	92,15	1,34	2,72	93,75
шерстяного очеса	18	10	68,1	95,48	0,84	0,1	98,40

Как видно из табл. 40, препараты фибриллярного кератина представляют собой хорошо очищенные от сопутствующих веществ белковые субстанции, в которых содержание основного компонента составляет в среднем 95 %. Незначительное содержание минеральных и жировых веществ в препаратах обусловлено тем, что в процессе химической модификации кератинсодержащих отходов они удаляются из образующихся полуфабрикатов на стадиях промывок.

Если сравнить аналогичные показатели, характеризующие исходное сырье (табл.21) видно, что в конечных продуктах золы и жира содержится в несколько раз меньше.

Следует также отметить, что содержание жировых веществ в конечных продуктах напрямую связано со степенью зажиренности исходного сырья.

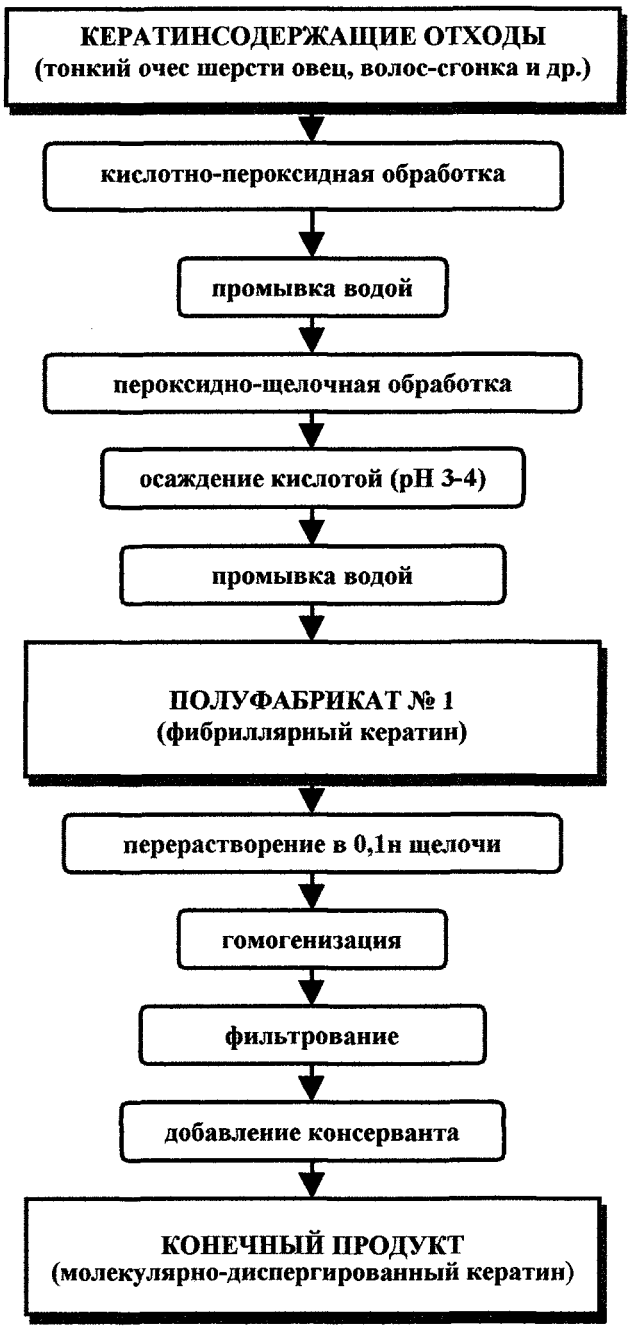


Рис. 27. Технологическая схема получения препарата кератина

Полученные данные свидетельствуют о том, что использованные технологические приемы, позволяют получить достаточно хорошо очищенный раствор фибриллярного кератина. По всей вероятности, полученные нами препараты представляют собой фракцию кератинов, называемых в литературе α-кератозой или S-карбоксиметилкератеином А (286).

Технологическая схема получения солюбилизированного кератина представлена на рис. 27.

Обобщая результаты экспериментов по поиску оптимальных способов целенаправленного получения высокоочищенных препаратов фибриллярных белков из отходов сырья животного происхождения, следует отметить преимущества пероксидно-щелочных воздействий на структуру биотканей как соединительнотканного, так и эпидермального происхождения.

ГЛАВА 5. Выбор показателей, характеризующих качество препаратов фибриллярных белков

Известно, что качество продукции определяется как совокупность свойств, обуславливающих ее пригодность удовлетворять определенные потребности в соответствии с ее назначением (1, 102).

Разработка способов, а затем и технологий получения высокоочищенных препаратов солюбилизированных фибриллярных белков включает в себя такой важный аспект как создание регламентированных инструкций по изготовлению и контролю качества готовой продукции.

Естественно, что на первых этапах такого рода исследований необходимо принимать во внимание и анализировать органолептические показатели, результаты, полученные в ходе физических, физико-химических, биохимических, иммунохимических, микробиологических, токсикологических и др. исследований.

Впоследствии это позволяет выбрать наиболее информативные показатели, определить допустимые пределы их вариации и предложить определенную систему критериев, характеризующих качество продукции.

Для того чтобы рекомендовать препараты и материалы на основе коллагена и других фибриллярных белков для применения в ветеринарной и медицинской практике, косметологии, биотехнологии необходимо, чтобы они отвечали соответствующим требованиям, а именно: имели высокую степень химической чистоты, были не токсичны, не обладали антигенностью.

5.1. Оценка химической чистоты препаратов

Критериями чистоты препарата могут служить такие показатели как содержание основного вещества, наличие примесей, а также его электрофоретические характеристики. Подтверждением химической чистоты препаратов коллагена, эластина и кератина могут служить данные, представленные в табл. 34, 36, 39, 40 **главы 4**.

Результаты электрофоретического анализа продуктов растворения коллагена из ахилловых сухожилий крупного рогатого скота (рис. 28) полностью

подтверждают представления о молекулярной гетерогенности этого белка.

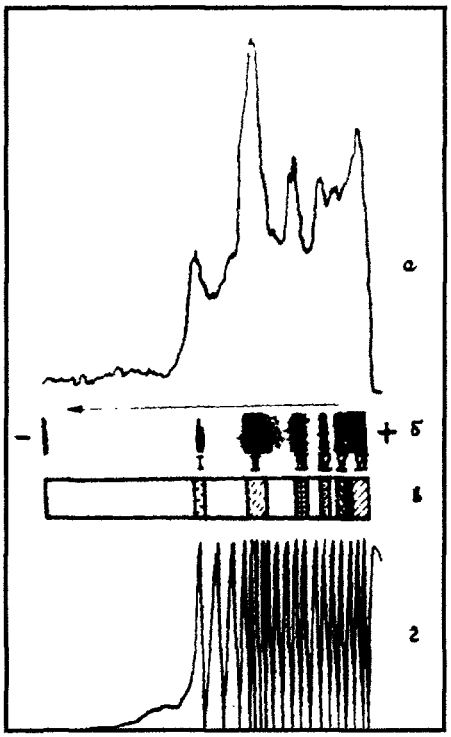


Рис. 28. Диск-электрофореграмма и денситограмма препарата ПРК:
а) кривая записи белковых фракций на денситометре;
б) диск-электрофореграмма (фото);
в) диск-электрофореграмма (схема);
г) интегрирующая кривая записи общего белка на денситометре.

Данные, характеризующие фракционный состав препарата, представлены в табл. 41. Как видно из таблицы, в растворе коллагена присутствуют различные по молекулярной массе фракции, соответствующие как неассоциированным молекулам коллагена, так и ассоциатам, представляющим собой, судя по величинам их молекулярных масс, димеры, тримеры и пентамеры коллагена.

Таблица 41

Относительное содержание белка во фракциях препарата ПРК и их относительная электрофоретическая подвижность

Определяемая величина	Фракции препарата ПРК					
	I	II	III	IV	V	VI
Относительное содержание белка, %	8,87	39,01	16,63	10,08	6,75	18,65
Относительная электрофоретическая подвижность:						
а) катодная граница	0,553	0,388	0,246	0,153	0,106	0,068
б) анодная граница	0,506	0,329	0,212	0,129	0,082	—

Полученные данные (119,145) свидетельствуют о том, что выделенный нами препарат представляет собой преимущественно коллаген I типа. Они дают

четкую картину присутствия тропоколлагеновых частиц в препарате в виде ассоциатов, имеющих молекулярные массы, скорее всего димеров, тримеров и, возможно пентамеров, что совпадает с мнением других авторов о полиморфизме коллагена (44, 350).

Однако, на наш взгляд, электрофоретическая оценка чистоты любого фибриллярного белка по такому показателю как "электрохимическая гетерогенность" целесообразна лишь при проведении высокоточных исследований, тогда как показатель "содержание основного вещества" более приемлем при контроле качества производственных партий.

5.2. Токсико-гигиенические показатели качества препаратов фибриллярных белков

Токсико-гигиенические характеристики препарата в ряде случаев является определяющими, особенно, если речь идет о возможностях использования его в косметологии, ветеринарной или медицинской практике. Требования такого рода показателям весьма жесткие. Они определяются соответствующими инструкциями и нормативными документами (39, 94, 95, 103).Поэтому при оценке качества препарата токсико-гигиенические показатели могут оказаться более значимыми, чем, например, данные, характеризующие его химическую чистоту.

В связи с тем, что препараты коллагена, эластина и кератина имеют белковую природу, они, как показали результаты микробиологических испытаний, подвержены обсемененности различными видами микроорганизмов, среди которых могут преобладать плесневые и дрожжеподобные грибки и спорообразующие бактерии. Поэтому препараты фибриллярных белков нуждаются в тщательном подборе к ним консервантов.

В ходе экспериментов было установлено, что получить микробиологически чистые препараты фибриллярных белков можно при добавлении к ним таких препятствующих микробному росту средств как бронопол (0,2 %), формалин (1 %), параформ (0,4 %), аквакон (0,8 %), нипаэфиры (0,4 %). Контроль образцов через неделю после добавления в них консервантов показал, что после посева

на питательные среды и инкубации в течение 48 часов в термостате при 37°С роста микроорганизмов выявить не удается.

Второй этап работы заключался в проверке антимикробной устойчивости полученных микробиологически чистых препаратов фибриллярных белков. Для этого в образцы, содержащие консерванты, вносили смесь плесневых и дрожжеподобных грибковых культур Penicillium sp. и Candida utilis в концентрации 10^6 клеток/г. Контроль проб образцов путем посева на питательную среду через 1, 3 и 7 суток после заражения выявил рост тест-культур в образцах фибриллярных белков с бронополом образцы с остальными консервантами оказались устойчивы и к заражению тест-культурами.

Таким образом, параформ, аквакон и нипаэфиры можно с успехом использовать для предохранения препаратов фибриллярных белков от поражения микробными организмами.

Тем не менее, оценку антимикробной устойчивости препаратов необходимо, на наш взгляд, проводить выборочно в течение всего предполагаемого срока хранения.

Следует подчеркнуть, что с учетом важности при оценке качества препарата такого показателя как "микробная обсемененность", его целесообразно включить в перечень критериев, подлежащих обязательной проверке.

В связи с тем, что препараты фибриллярных белков предполагалось использовать в качестве ингредиентов или основы для ветеринарных, медицинских и косметических средств, токсикологические исследования были направлены на разработку предельно-допустимых уровней их ввода в рецептуры такого рода изделий.

В результате проведенных экспериментов установлено, что по величине средне смертельной дозы при однократном введении в желудок крыс и мышей (DL_{50}) препараты коллагена, эластина и кератина относятся к 4 классу малоопасных малотоксичных веществ. Величина DL_{50} для обоих видов подопытных животных превышала максимально вводимую дозу 10 г/кг. Гибели животных и клинической картины интоксикации при этом не наблюдалось. Различия меж-

видовой чувствительности не выражены.

Кумулятивный эффект препаратов исследовали при повторном введении веществ в нарастающих дозах, начиная с 1 г/кг, составляющей 1/10 часть от максимально вводимой дозы (10 г/кг). Гибели и признаков интоксикации подопытных крыс не отмечено в течение всего опыта и в последующий 2-х недельный период. Животных подопытной группы не отличались от контрольных по поведению, внешнему виду, приросту массы тела, что в совокупности с отсутствием гибели животных свидетельствовало об отсутствии выраженных кумулятивных свойств коллагена, эластина и кератина.

Кожно-резорбтивный эффект в месячном эксперименте с ежедневным воздействием продуктов на 2/3 длины хвоста мышей не выявлен: гибели животных не было, картина интоксикации отсутствовала.

Однократное и повторное (12-дневное) нанесение чистых не разведенных продуктов на кожу кроликов и морских свинок не вызывало раздражения кожных покровов, раствор коллагена, эластина и кератина (в максимально допустимых для ввода количествах, соответственно 5, 3, 10 % от объема готовой композиции) в 24-дневном эксперименте с ежедневным воздействием на кожу животных не вызывал раздражения кожных покровов ни у кроликов, ни у морских свинок. Показатели функционального состояния кожных покровов опытных животных (эритема, толщина кожной сладки, величина pH, нейтрализующая способность, температура и проницаемость кожи) находились в пределах физиологических колебаний контроля.

Коллаген, эластин, кератин не обладают сенсибилизирующим эффектом. Так, при длительном эпикутанном воздействии с использованием 5 % раствора коллагена, 3 % эластина и 10 % кератина установлено отсутствие сенсибилизирующего эффекта, что нашло подтверждение при гистоморфологическом исследовании образцов кожи животных. При однократном внесении в конъюнктивальный мешок глаза кроликов 1-2 капель не разведенных продуктов наблюдалось слабое раздражение слизистых оболочек, проходящее в течение 10-15 минут. В перечисленных выше концентрациях фибриллярные белки не оказы-

вают раздражающего действия на слизистые оболочки и роговицу глаз.

Таким образом, проведенные исследования позволяют считать, что препараты фибриллярных белков:

- являются малотоксичными и малоопасными продуктами (4 класс по ГОСТ 12.1.007-76);
- не оказывают кожно-раздражающего, резорбтивного и сенсибилизирующего действия, в концентрациях предполагаемого ввода в рецептуры изделий;
- не оказывают повреждающего действия на слизистые оболочки глаза и роговицу.

Естественно, что токсикологическая оценка фибриллярных белков как сырья для, например, косметических средств не должна исключать или заменять собой последующую оценку качества готовых изделий, в состав которых входят эти биологически активные добавки.

5.3.Оценка агрегативной стабильности препаратов коллагена, эластина и кератина

Срок годности препарата обычно напрямую зависит от стабильности показателей, характеризующих его качество.

В связи с тем, что солюбилизированные препараты коллагена, эластина и кератина являются биоактивными дисперсными системами и представляют особый интерес как белковое косметическое сырье, в данном случае среди других потребительских свойств важное значение приобретает такой показатель как их агрегативная стабильность в процессе хранения.

Изучение коллоидно-химических аспектов устойчивости белковых субстанций коллагена, эластина и кератина свидетельствует о том, что эти биополимеры в солюбилизированном виде присутствуют в основном в виде молекулярных ассоциатов и лишь 0,1 % от их общего количества – в виде более крупных агрегатов, т.е. коллоидных частиц. Тем не менее, дисперсность именно коллоидных фракций характеризует агрегативную устойчивость раствора (28, 194, 195). Тот факт, что коллоидная фаза раствора отражает общие закономерности изменений, происходящих в системе в целом, объясняется, вероятно, тем, что образо-

вание ее является результатом сложных физико-химических процессов, имеющих место в растворе белка на молекулярном и ассоциативном уровнях. Наличие ассоциатов в растворах белков, их укрупнение за счет соединения друг с другом до появления достаточно крупных частиц способствует образованию коллоидных частиц ультрамикронных и субмикронных размеров.

Оценка устойчивости белковых субстанций коллагена, эластина и кератина, проведенная с помощью метода поточной ультрамикроскопии, позволила рассчитать количество коллоидных частиц, содержащихся в 1 мл исходных гидрозолей коллагена, эластина и кератина. В среднем оно составляет $2{,}9 \cdot 10^9$, $0{,}92 \cdot 10^{10}$ и $1{,}26 \cdot 10^{10}$ частиц, соответственно. Также были рассчитаны средние значения радиусов коллоидных частиц коллагена, эластина и кератина. Согласно полученным данным, они равны 72, 120 и 110 нм, соответственно. На рис.29-31 представлены гистограммы распределения частиц в растворах фибриллярных белков в зависимости от концентрации, времени старения, радиуса. Анализ гистограмм позволяет считать рассматриваемые белковые субстанции монодисперсными системами. Информация о радиусе частиц и его зависимости от времени, полученная на основе обработки гистограмм распределения частиц по размеру, касается статистического средневзвешенного значения радиуса.

Нами выявлена достаточно высокая агрегативная устойчивость растворов исследуемых белков в процесс хранения. Результаты измерения концентрации частиц в течение 1 года для коллагена и 6 месяцев для эластина и кератина показали, что изменения на превышают ±10% от исходных показателей, и, таким образом, можно считать, их количество остается примерно на одном уровне. Следует отметить, что на первых стадиях хранения растворов имеет место флуктуационные смещения максимумов на кривых распределения в сторону образования то крупных, то мелких частиц. Однако через определенное время происходит стабилизация системы, и в растворе начинают преобладать коллоидные частицы средних размеров.

Движение центров распределения хорошо видно на гистограммах. Изменение дисперсного состава частиц, т.е. их концентрации и размера можно объяс -

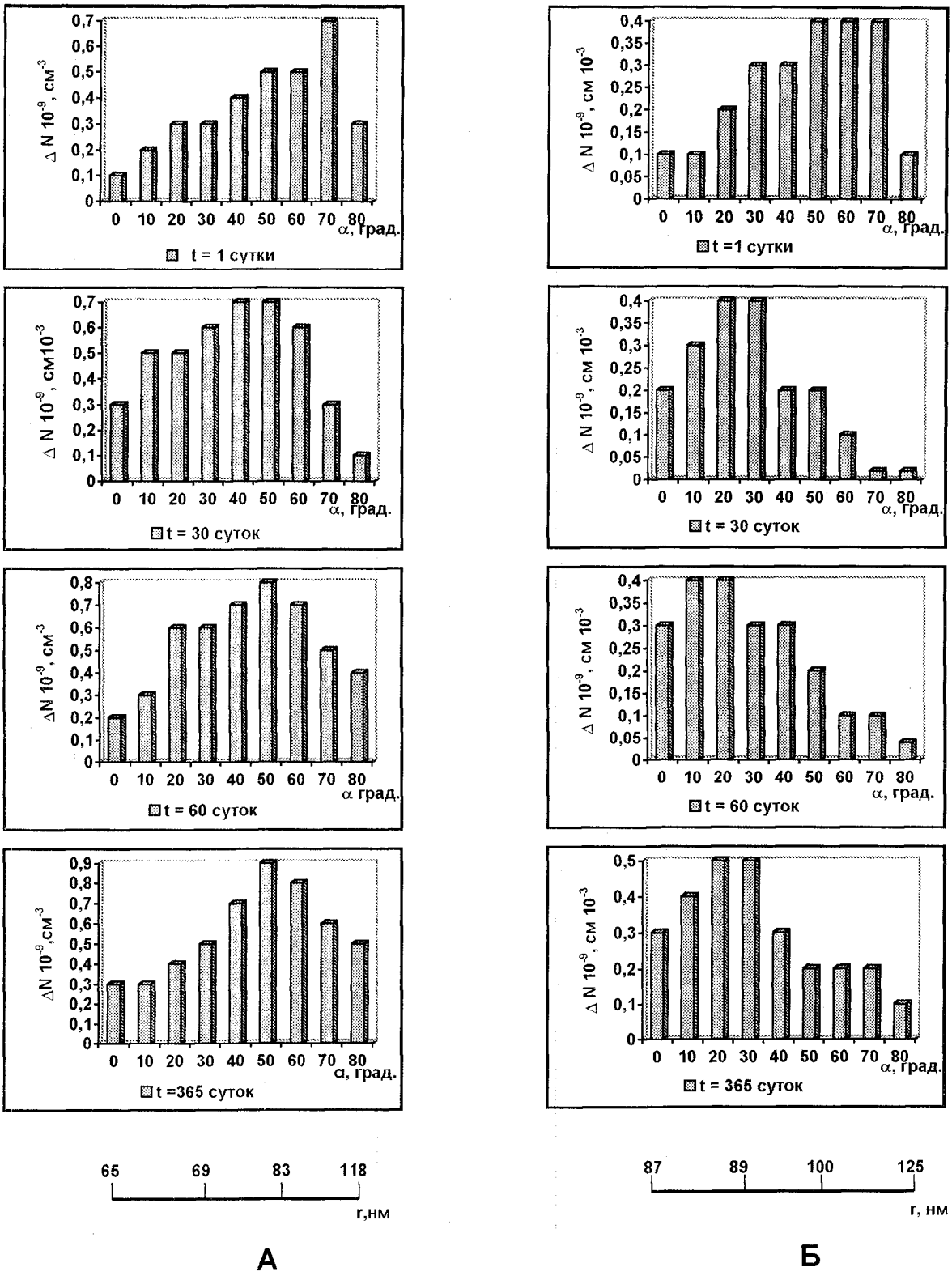


Рис. 29. Гистограммы распределения частиц в коллоидной фазе растворов коллагена с концентрацией белка 0,002 % (**А**) и 0,008 % (**Б**) при хранении в течение 1, 30, 60 и 365 суток.

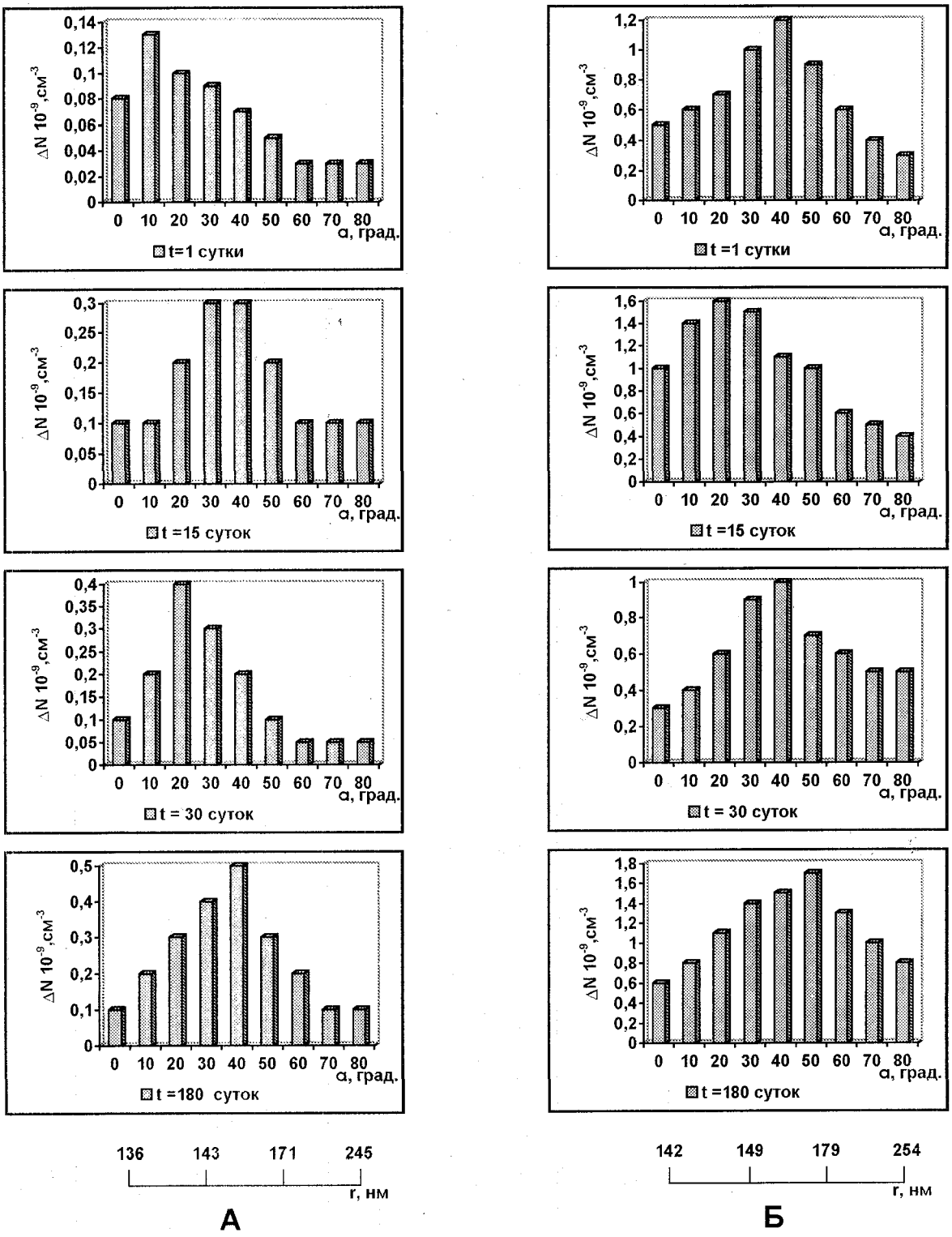


Рис. 30. Гистограммы распределения частиц в коллоидной фазе растворов эластина с концентрацией белка 0,002 % (**А**) и 0,008 % (**Б**) при хранении в течение 1, 15, 30 и 180 суток.

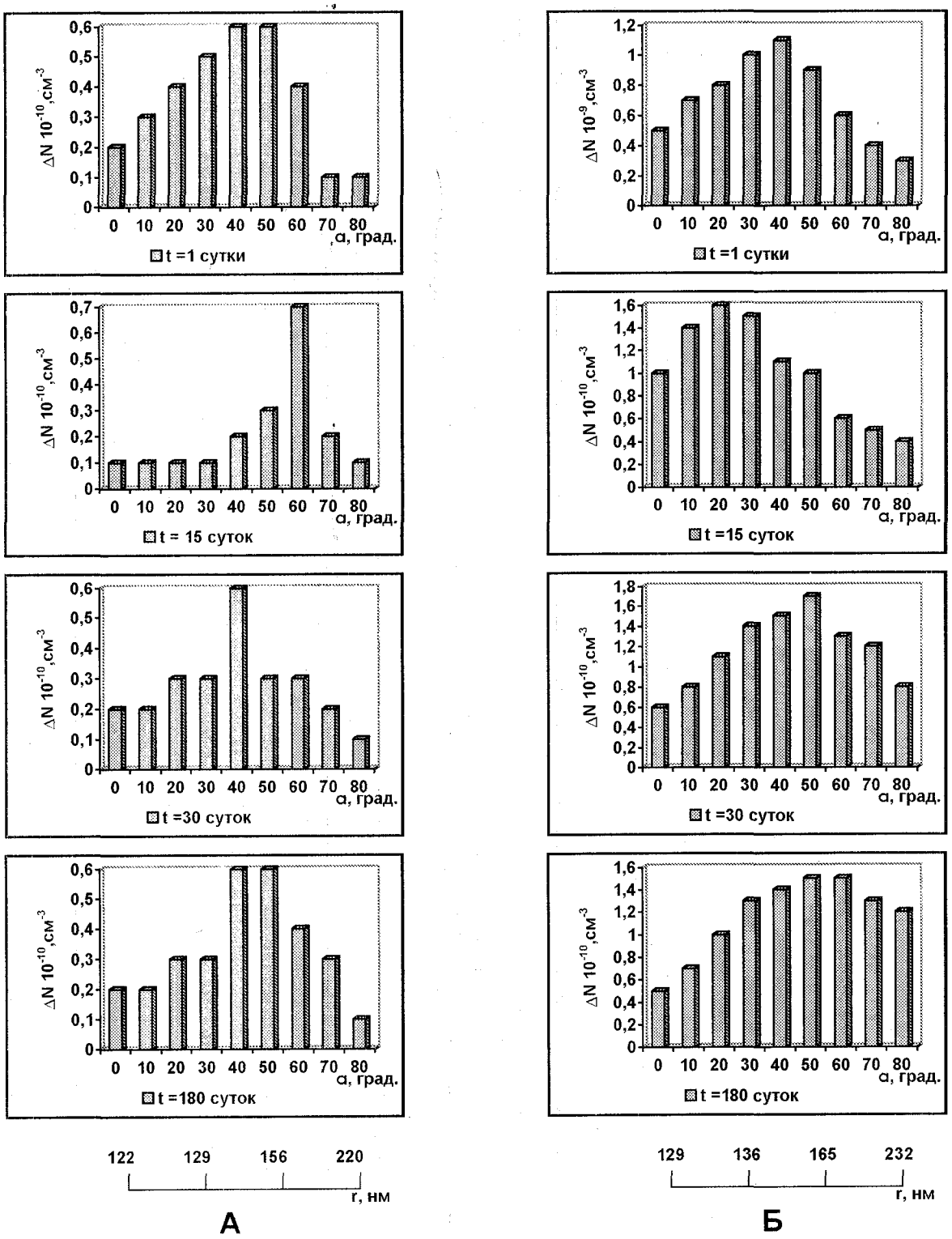


Рис. 31. Гистограммы распределения частиц в коллоидной фазе растворов кератина с концентрацией белка 0,002 % (**А**) и 0,008 % (**Б**) при хранении в течение 1, 15, 30 и 180 суток.

нить тем, что в объеме коллоидного раствора идут процессы не только коагуляции, но и пептизации. Устойчивость коллоидных систем в растворах обеспечивается силами различной химической природы, действующими между частицами. Наличие развитой сольватной оболочки вокруг коллоидных частиц обусловливает их устойчивость в растворах белка.

Исследование растворов фибриллярных белков свидетельствует о наличии в них частиц всех величин - от молекулярных ассоциатов до агрегатов субмикронных и микронных размеров. С увеличением времени старения высота столбцов диаграмм может изменяться. При этом происходит некоторый сдвиг диаграммы вправо или влево, что свидетельствует об укрупнении или уменьшении размеров частиц, но тем не менее, фракционный характер дисперсии сохраняется. Анализ параметров устойчивости фибриллярных белков свидетельствует о том, что частицы коллагена имеют несколько большую агрегативную устойчивость по сравнению с коллоидными системами эластина и кератина. При старении растворов число частиц уменьшается во всех фракциях. Уменьшение концентрации частиц фракций объясняется не только коагуляционными процессами, но и явлениями, связанными с растворением частиц или перекон-денсацией. Рост диаметра частиц в каждой фракции сопровождается уменьшением общего числа частиц.

Рассчитанные параметры дают возможность считать белковые субстанции коллагена, эластина и кератина устойчивыми препаратами, пригодными для изготовления различных косметических средств.

5.4. Антигенные и иммуногенные свойства коллагена и препаратов на его основе

В связи с практически неограниченными возможностями, которые появляются при использовании коллагена в ветеринарной и медицинской практике, возникает проблема тестирования антигенности препаратов солюбилизированного коллагена и иммуногенности различных форм искусственных коллагеновых материалов, т.к. длительное или многократное их применение может привести к выработке антител к коллагену, а это, в свою очередь, - к возникнове-

нию гиперчувствительности замедленного или немедленного типа (116,139, 404).

Все это определило насущность разработки тест-системы для обнаружения антител к коллагену. Крайне слабая иммуногенность коллагена (404) потребовала использования не только использования высокоактивных гипериммунных специфических сывороток, но и применения высокочувствительных методов для ее оценки.

Разработанная нами схема (128) краткосрочного усиленного грундирования в сочетании с двумя отдаленными реиммунизациями позволила за сравнительно короткий срок (1,5 месяца) получить антисыворотки с довольно высоким титром антител к коллагену (табл.42).

Как видно из табл.42, в первые две недели после цикла первичной иммунизации в сыворотках присутствуют в основном слабо аффинные (обладающие незначительной степенью сродства к антигенным детерминантам) антитела, а в более поздние сроки – высоко аффинные.

Переходя к описанию результатов по разработке диагностической тест-системы для выявления антител к коллагену следует подчеркнуть, что попытки решить эту задачу с помощью таких общепринятых иммунологических методов как реакция преципитации, реакция двойной иммунодиффузии, реакция связывания комплемента не имели особого успеха ввиду особенностей антигенного строения молекулы коллагена и его чрезвычайно большой молекулярной массы. Наиболее широко используемая в практике для анализа антиколлагеновых сывороток реакция непрямой гемагглютинации обладает низкой чувствительностью и малой эффективностью вследствие сложностей, связанных с изготовлением эритроцитарного диагностикума и отсутствием достоверной количественной оценки результатов (404).

Весьма перспективным методом, дающим объективные результаты и весьма чувствительным по сравнению с другими серологическими реакциями, способным существенно дополнить или полностью заменить их, считается реакция энзим-меченых антител (РЭМА), с успехом применяемая в настоящее время в ди-

Таблица 42

Титры антисывороток к коллагену в зависимости от фазы иммунизации

Фаза иммунизации	номер сыворотки									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Грундирование	1:100	1:25	1:400	1:200	1:50	1:200	1:100	1:100	1:200	1:50
I реиммунизация	1:6400	1:1600	1:12800	1:6400	1:3200	1:12800	1:3200	1:1600	1:3200	1:800
II реиммунизация	1:6400	1:3200	1:6400	1:6400	1:6400	1:12800	1:6400	1:300	1:1600	1:800

агностике самых различных заболеваний, как инфекционных, так и неинфекционных (29, 417).

Следует отметить, что по вопросу применения РЭМА для обнаружения антител к коллагену мы не обнаружили в доступной литературе никакой информации. В процессе работы мы вынуждены были отказаться от рекомендуемой стандартной методики постановки реакции, так как она не учитывает особенности сорбции различных антигенов на полистироле.

Благодаря использованию реакции энзим-меченых антител оказалось возможным не только выявлять, но и количественно определять антитела к коллагену в полученных антисыворотках (рис.32).

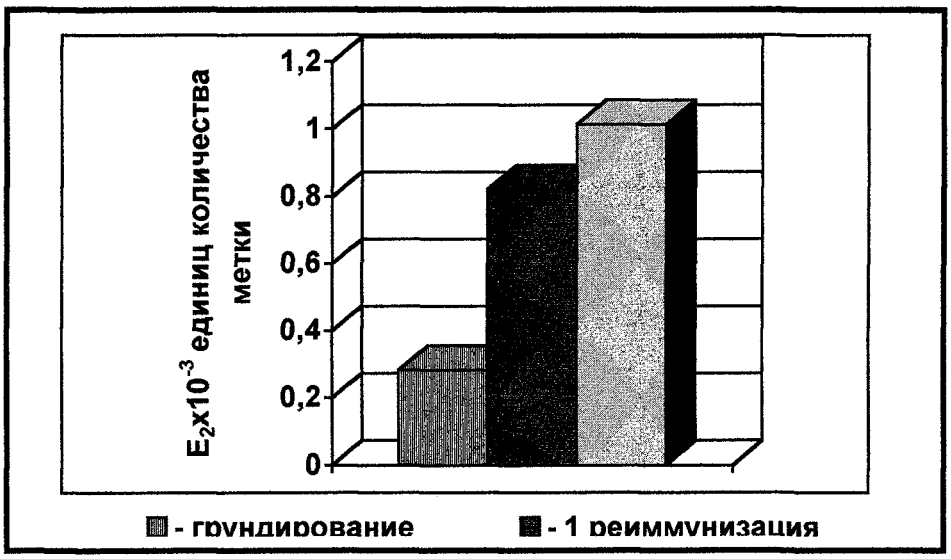


Рис. 32. Учет количества специфических антител а коллагену в сыворотках гипериммунизированных кроликов (n=10, титр 1:200)

Приведенные на рис.32 данные свидетельствуют о статистически значимом повышении уровня антител с каждым последующим циклом иммунизации и, кроме того, наглядно демонстрирует перспективность применения РЭМА для обнаружения антител к коллагену, так как используемая в данном случае система учета результатов адекватно отражает количество антител в исследуемых сыворотках (155).

Создание тест-системы позволило оценить степень иммуногенности коллагеновых губок по сравнению с самим коллагеном.

В опытах по определению содержания белка в экстракте из коллагеновых губок было установлено, что 10-15 % от общего количества белка переходит из губки в раствор.

Результаты сравнительного анализа антигенности коллагена и экстрактов коллагеновых губок с помощью пула гипериммунных сывороток к коллагену представлены на рис.33.

Как видно из рис.33, за положительную реакцию в тест-системе можно считать разведение пула антисывороток 1:3200, а в сравниваемой системе 1:200.

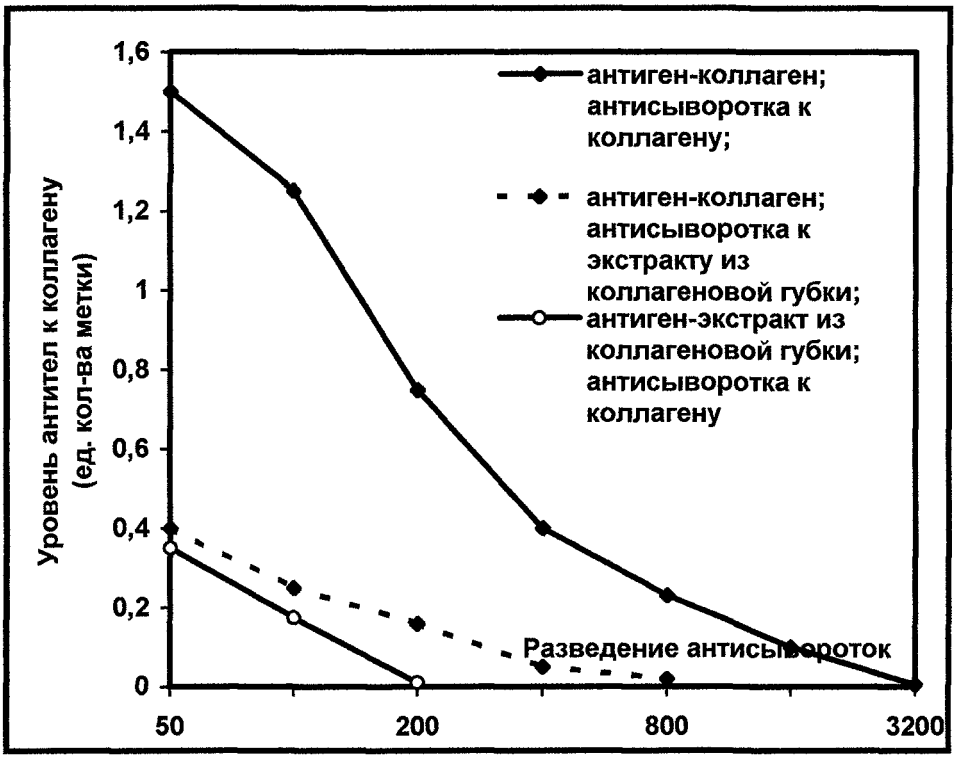


Рис.33. Сравнительный анализ иммуногенности коллагена и экстракта из коллагеновых губок

Если рассматривать тест-систему как эталон антигенности коллагена, то можно считать, что на долю экстрагируемого компонента приходится до 6 % общей антигенной активности коллагена. Тем не менее, такой незначительной антигенности оказывается достаточно, чтобы вызвать у кроликов иммунный ответ к экстракту из коллагеновых губок и продемонстрировать с помощью РЭМА присутствие антител в индивидуальных кроличьих сыворотках, хотя и в относительно низких концентрациях.

Таким образом, хотя некоторые авторы (184, 201, 237) считают, что колла-

геновые губки, подвергнутые дублению и стерилизации γ-облучением практически не антигенны, полученные нами данные свидетельствуют не только о наличии антигенной активности в экстракте из губок, вследствие перехода в раствор некоторого количества коллагена, но и указывает на то, что коллагеновые губки могут оказаться небезразличными для живого организма ввиду их способности вызывать иммунный ответ и что всесторонние дальнейшие исследования, направленные на тестирование иммуногенных свойств коллагеновых препаратов, применяемых в ветеринарной и медицинской практике, крайне необходимы (139).

Полученные нами данные указывают на то, что коллагеновые губки могут оказаться небезразличными для живого организма ввиду их способности вызывать иммунный ответ. Однако в связи с тем, что количество антител к коллагену не намного превышает пороговый уровень, использование коллагеновых материалов для наружного применения вполне допустимо, если только у пациента не существует гиперчувствительности к этому белку. На наш взгляд, оценка качества коллагеновых материалов по такому показателю как "антигенность" особенно актуальна для препаратов, применяемых в лечебных целях в ветеринарии и медицине.

В связи с тем, что в ходе исследований были получены коллагеновые препараты различных форм, в том числе и биологические покрытия на основе нерастворимого коллагена, представляло интерес оценить степень иммуногенности ксенотрансплантатов из дермы крупного рогатого скота (147, 148).

Результаты количественной оценки силы иммунного ответа организма-хозяина на имплантированные препараты, полученные путем модификации соединительной ткани, проведенные с помощью реакции энзим-меченых антител, модифицированной нами с учетом антигенных особенностей коллагена рис.34).

Оказалось, что максимальный уровень циркулирующих антител (в единицах оптической плотности) наблюдается у животных, которым имплантировали препарат необработанной дермы (0,114±0,012). После кислотно-солевой обработки их количество уменьшилось почти в 2,5 раза (0,048±0,009). Щелочно-

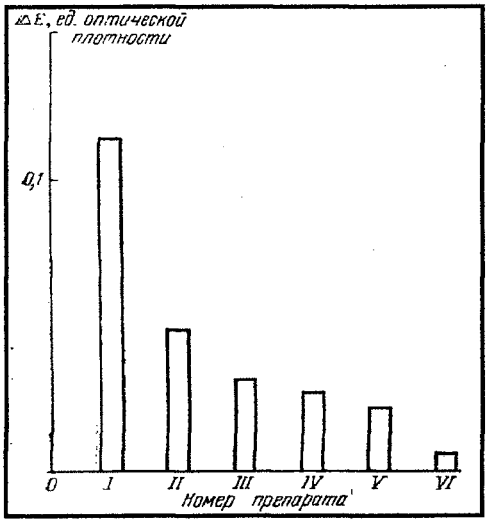


Рис.34.
Сила гуморального иммунного ответа на ксенотрансплантаты из дермы крупного рогатого скота, модифицированной в результате различных обработок.

солевое воздействие также ведет к значительному понижению иммуногенных свойств имплантата. Так, после 24- и 48-часового контакта с щелочно-солевым раствором модифицированная дерма способная вызывать иммунную реакцию, при которой относительное содержание антител составляло соответственно 0,032±0,005 и 0,027±0,008 ед. оптической плотности. Гелеобразный препарат продуктов растворения коллагена и коллагеновая губка вызывали у животных минимальный иммунный ответ (соответственно 0,022±0,001 и 0,0065±0,001).

Полученные нами результаты свидетельствуют о том, что в процессе различных обработок под действием воды, кислот, щелочей и солей происходит удаление отдельных компонентов соединительной ткани, способствующих формированию ее антигенных и иммуногенных свойств. К ним в первую очередь можно отнести неколлагеновые белки и пептиды и, вероятно, углеводные компоненты соединительной ткани. Крайне незначительная активность очищенного коллагена, а также материалов на его основе, обусловленная, очевидно, довольно высокой толерантностью этого белка, свидетельствует о целесообразности применения препаратов из гетерологического коллагена в ветеринарной хирургии.

5.5. Оценка показателей, характеризующих качество препарата на основе фибриллярного коллагена

Ассортимент созданных биоматериалов наряду с ксенотрансплантантами из дермы шкур крупного рогатого скота включал в себя биологическое покрытие

для ран, изготовленное из спилка свиной дермы.

Ниже представлены результаты лабораторно-экспериментальной проверки соответствия изготовленных, согласно разработанному способу, трех лабораторных серий биоматериала требованиям, предъявляемым к качеству препаратов подобного назначения (103).

Результаты опытов по определению основных показателей, характеризующих химический состав исходного сырья и трех лабораторных серий готового биоматериала, представлены в табл.43.

Как видно из табл. 43, отдельные показатели химического состава исходного сырья в процессе его переработки в готовый биоматериал изменялся незначительно. Это можно сказать о содержании общего белка и, в частности, коллагена, минеральных веществ, а также гексоз. В то же время – содержание таких компонентов как жир, неколлагеновые белки, гексозамины резко снижается, что свидетельствует об очистке биоматериала от неколлагеновых биополимеров.

Сравнительный анализ полученных результатов позволяет выбрать такие показатели химического состава, контроль которых может дать максимальную информацию о качестве готового биоматериала. Так, в данном случае, наиболее целесообразной, на наш взгляд, может стать оценка качества готового препарата по содержанию в нем биополимеров неколлагеновой природы.

По внешнему виду готовый биоматериал представляет собой пласт обработанного соответствующим образом спилка дермы, имеет белый или сероватобелый цвет, слегка шероховатую поверхность. Он влажный, мягкий эластичный на ощупь.

Физико-химические параметры трех лабораторных серий полученного био логического покрытия приведены в табл.44.

Согласно нашим данным, в готовом препарате содержится до 30 % влаги. К сожалению, оборудование, использованное для распиливания исходного сырья, не позволило получить препарат меньшей толщины, это могло бы способствовать более быстрому заживлению ран. Проведенные эксперименты показали,

Таблица 43

Сравнительная характеристика основных показателей химического состава исходного сырья и готового биоматериала

Исследуемый образец	Содержание, % от абсолютно сухого вещества (n=5)						
	традиционные методы анализа химического состава			метод комплексного биохимического анализа			
	минеральные вещества	липиды	общий белок	коллаген	неколлагеновые белки	гексозы	гексозамины
Исходное сырье (свиная спилковая обрезь)	1,98	6,31	87,42	89,82	1,85	0,527	0,637
Готовый биоматериал: - серия № 1 - серия № 2 - серия № 3	 2,21 2,48 2,58	 3,13 3,22 3,09	 90,14 92,11 89,86	 93,92 92,06 92,88	 - - -	 0,459 0,431 0,424	 0,337 0,369 0,344
В целом по препарату	2.42	3,15	90,70	92,95	-	0,438	0,350

Таблица 44

Физико-химические параметры готового биоматериала (n=5)

№ лабораторной серии	Содержание влаги, %	Толщина биоматериала, мм	Температура сваривания, °С	Влагоемкость, %		Пористость, %
				B_1	B_2	
1	27,46	0,56	52,4	70,15	74,06	29,95
2	29,58	0,56	53,6	84,97	88,22	27,47
3	31,27	0,66	54,8	58,08	61,35	31,79
В целом по препарату	29,44	0,59	53,6	71,01	74,54	28,74

что готовый препарат обладает довольно стабильной внутренней структурой. Об этом свидетельствует узкий диапазон, в котором варьирует величина температуры сваривания.

Одно из основных требований, предъявляемых к временным биологическим покрытиям, заключается в том, что они должны хорошо адсорбировать раневой экссудат. Анализ влагоемкости образцов готового препарата позволил установить высокую гидрофильность исследуемых образцов. Так, в течение первых двух часов препарат способен поглотить в среднем более 70 % влаги. В дальнейшем скорость процесса значительно снижается и в течение последующих 22 часов препарат адсорбирует всего 3,47 % влаги.

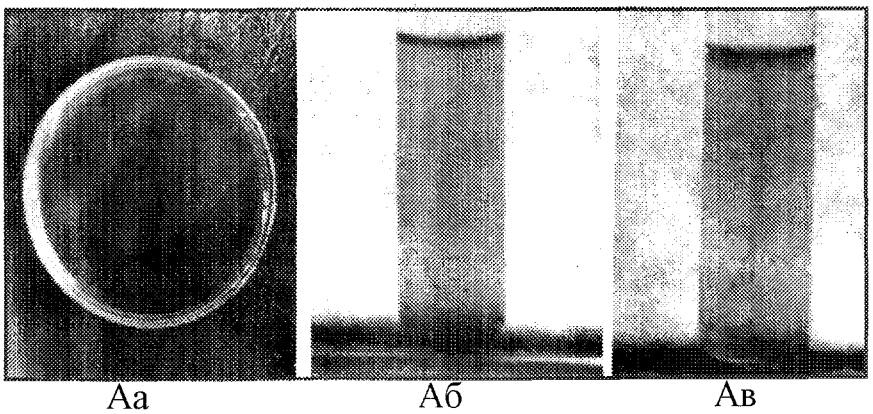
В связи с тем, что сорбционные свойства зависят главным образом от пористо-волокнистой структуры препарата, готовый биоматериал был охарактеризован по такому показателю, как пористость (77).

В образцах из трех лабораторных серий она оказалась примерно одинаковая и составила в среднем 28,74 %.

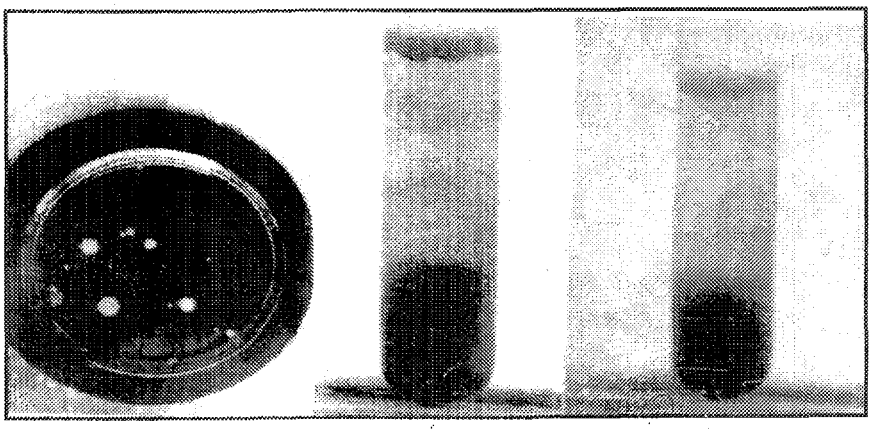
Представленные в табл. 44 результаты, свидетельствуя о стабильности физико-химических параметров коллагенового биоматериала, получаемого по разработанной технологической схеме, в комплексе с показателями химического состава также могут служить своеобразными критериями, характеризующими его качество, причем наиболее информативным из них следует, по всей вероятности, считать пористость.

Особое внимание в работе было уделено биологическим и клиническим методам оценки качества разработанного коллагенового раневого покрытия. С этой целью лабораторные серии препарата были проверены на стерильность, на отсутствие пирогенности и токсичности, а также охарактеризованы с точки зрения иммуногенности и влияния на скорость заживления ран.

Микробиологические испытания коллагенового биоматериала на стерильность показали, что все три лабораторные серии готового препарата ни на одной из использованных в работе питательных сред (агар-агар, мясопептонный бульон, полужидкий агар) не дают роста микроорганизмов (рис.35. Аа, Аб, Ав). Контроль бактериальной обсемененности нестерильного конечного продукта, полученного по разработанной технологической схеме, на тех же питательных средах (рис.35. Ба, Бб, Бв) продемонстрировал присутствие в исследуемых образцах различных форм микроорганизмов. Полученные результаты свидетельствуют о том, что использованный вариант упаковки биоматериала и режимы последующей стерилизации полностью обеспечивают его стерильность.



Аа Аб Ав



Ба Бб Бв

Рис. 35. Бактериальная обсемененность коллагенового биоматериала (А) и нестерилизованного препарата (Б) на агар-агаре (а), мясо-пептонном бульоне (б), полужидком агаре (в).

Наряду со стерильностью не менее важными критериями, определяющими возможность практического применения любого препарата ветеринарного и медицинского назначения, является его апирогенность и отсутствие токсичности. Результаты экспериментов по определению степени пирогенности коллагенового биоматериала приведены в табл. 45.

Таблица 45

Учет степени пирогенности трех лабораторных серий готового биоматериала (n=3)

Номер лабораторной сери препарата	Масса животных, кг		Температура тела животных, °С			
	до начала опыта	после окончания опыта	до начала опыта	после введения препарата, ч.		
				1	2	3
I	3,800	3,810	38,77	39,13	38,97	38,83
II	4,056	4,060	39,10	39,47	39,30	39,20
III	4,107	4,100	38,80	39,23	39,20	38,93

Как видно из представленных в таблице 45 данных, внутривенное введение подопытным животным экстрактов из образцов, взятых от трех лабораторных серий конечного продукта, вначале вызывает повышение температуры у животных в среднем на 0,4 °С. К концу опыта – через 3 часа после введения, этот показатель практически приходит в норму, т.к. не более, чем на 0,13 °С превышает температуру тела животных до его начала, что и является доказательством апирогенности.

Испытания образцов готового препарата на токсичность, заключавшиеся в проведении ежедневных (в течение 2-х недель) внутрибрюшных инъекций мышам экстрактов из коллагенового биоматериала, позволили охарактеризовать влияние препарата на организм подопытных животных по таким показателям как внешний вид, масса, температура тела, двигательная активность.

Результаты этого опыта, суммированные в табл. 46, свидетельствуют о безвредности препарата, т.к. никаких внешних проявлений отравления не наблюдается.

Анализ иммуногенных свойств образцов отдельных серий коллагенового

Таблица 46

Учет изменений в состоянии здоровья животных при определении токсичности

№ п/п	Количество подопытных животных		Показатели состояния здоровья животных (средние значения)							
	до опыта	после опыта	внешний вид		масса, г		Т, °С		двигательная активность	
			до опыта	после опыта	до опыта	после опыта	до опыта	после опыта	до опыта	после опыта
I	10	10	в норме	шерсть мягкая, блестящая, пищеварение не нарушено, цвет ушей, лап и хвостов не изменен	18,0	19,0	38,8	38,9	в норме	координация движений не нарушена
II	10	10	в норме		17,0	18,0	38,7	38,7	в норме	
III	10	10	в норме		18,0	19,0	38,7	38,7	в норме	

биоматериала по силе гуморального ответа организма-реципиента показал, что готовый препарат вызывает у подопытных животных иммунный ответ в среднем в 5 раз меньший, чем исходное сырье. Так, относительное содержание антител в сыворотках крови, взятой у кроликов, которым имплантировали образцы первой, второй и третьей серий готового препарата составляет 0,132±0,009, 0,120±0,04, 0,146±0,019 единиц оптической плотности соответственно, для исходного сырья величина этого показателя составляет 0,706±0,021 единиц оптической плотности.

Полученные результаты указывают на существование определенной зависимости между степенью очистки коллагена от сопутствующих биополимеров и иммуногенностью биоматериала.

Установленный факт нашел свое подтверждение на завершающем этапе исследований во время клинических испытаний готового препарата. Согласно нашим данным, заживление экспериментальных ран у животных при использовании в качестве биологического покрытия коллагенового биоматериала происходило на 5-7 суток быстрее по сравнению с контролем. Причем, к концу заживления ксенотрансплантат полностью не рассасывался, это происходило лишь на 30-40 сутки после операции. (Приложение.)

Таким образом, многоплановые комплексные исследования, выполненные с целью объективной и всесторонней оценки основных показателей и свойств коллагенового биоматериала, не только подтверждили правильность подбора условий и режимов всех стадий его производства, но и позволили уточнить критерии контроля качества готового препарата, подтверждая целесообразность использования его в качестве перевязочного материала, (покрытия для ран) в ветеринарной хирургической практике.

5.5. Применение тест-системы для диагностики коллагенозов у людей и животных

Благодаря высокой чувствительности разработанная тест-система оказалась весьма полезной для выявления сывороточных аутоантител к коллагену при различных патологических состояниях соединительной ткани (121,144). В связи

с тем, что коллаген I типа некоторых видов млекопитающих обладают определенной степенью иммунологического родства (128), нами была предпринята попытка использовать коллаген крупного рогатого скота в качестве антигена при анализе сывороток больных ревматоидным артритом (121).

При обследовании сывороток крови от 15 больных с классическим ревматоидным артритом и 15 доноров в скрининг-титре 1:200 (рис.36) установлено, что максимальный уровень антител к коллагену обнаруживается у больных до лечения при обострении процесса (1,004±0,0324 единиц оптической плотности). После лечения он достоверно снизился до 0,8752±0,0472 ($P<0,001$). У доноров уровень антител к коллагену не превышал 0,7081±0.0273, что статистически достоверно отличалось от такового у больных до и после лечения ($P_1<0,001$; $P_2<0,01$).

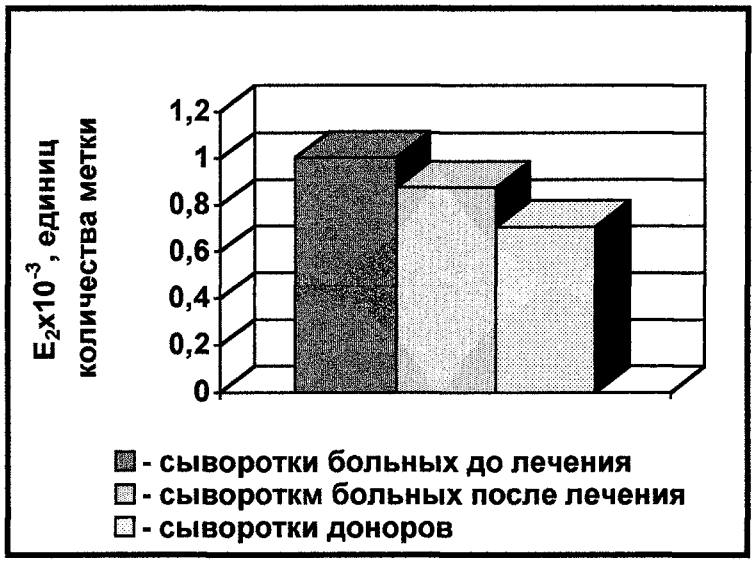


Рис.36. Динамика уровня антител к коллагену у больных ревматоидным артритом

Разработанная на основе РЭМА тест-системы для обнаружения антител к коллагену оказалась весьма эффективной при иммунодиагностике системных заболеваний животных (141). Так, при иммунохимическом анализе сывороток от 40 голов крупного рогатого скота с признаками коллагенозов различной степени тяжести и 10 сывороток от клинически здоровых животных (при рабочем разведении сывороток 1:80) было установлено, что максимальный уровень аутоантител к коллагену (1,327±0,032 единиц оптической плотности) имеет место

у животных в острой фазе заболевания. В сыворотках животных-хроников количество аутоантител достоверно снижалось до 0,893±0,047 (P<0,001). Что касается сывороток здоровых животных, то в них уровень аутоантител не превышал 0,354±0,028(рис.37).

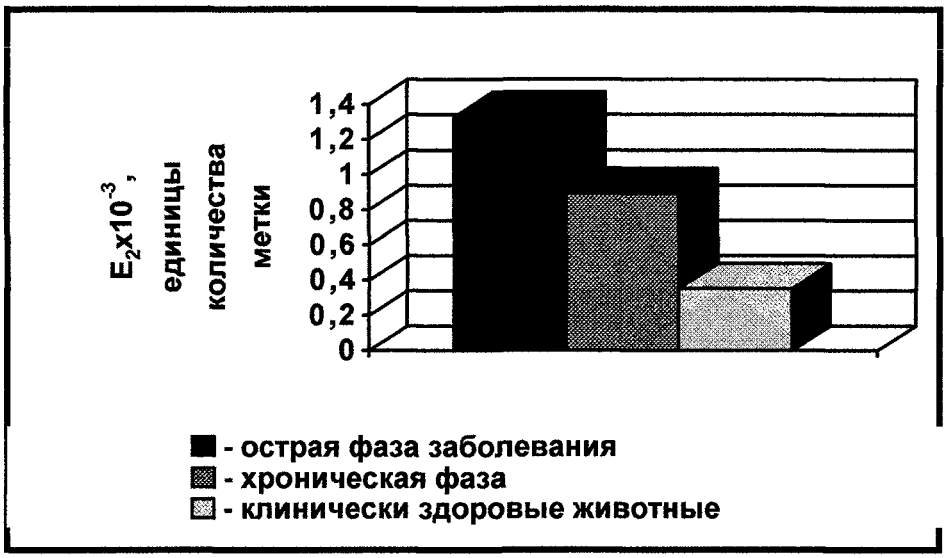


Рис.37. Динамика уровня аутоантител к коллагену
у крупного рогатого скота с признаками коллагенозов

Полученные результаты свидетельствуют о том, что уровень антител к коллагену при соответствующей клинической картине может иметь как диагностическое, так и прогностическое значение и широко использовать для контроля за эффективностью проводимого лечения, как у людей, так и у животных.

Обобщая результаты исследований, представленных в **главе 5**, следует отметить, что некоторые из рассмотренных выше критериев оценки качества препаратов фибриллярных белков были включены в нормативно-техническую документацию (ТУ) с целью установления единых норм и требований к показателям качества такого рода продукции (табл.47).

Таблица 47

Основные физико-химические характеристики препаратов

Название косметического продукта	Внешний вид, цвет	Водородный показатель (pH)	Подлинность	Массовая доля сухого вещества, %	Общее микробное число кл. / г. продукта, не более	Кол-во дрожжевых и плесневых грибков, кл. / г. продукта, не более	Массовая доля, % от сухого вещества
Коллаген	жидкость бесцветная, вязкая, слегка опалесцирующая	3,5-4,5	положительная реакция на коллаген	0,7-1,1	10^3	10^2	коллагена по оксипролину, 97,0-99,0
Эластин	однородная, непрозрачная жидкая масса светло-желтого цвета	6,5-7,5	положительная реакция на эластин	5,0-7,0	10^3	10^2	эластина по общему азоту, 95,0-98,0
Кератин	однородная жидкая масса от светло-серого до серого цвета	6,5-7,5	положительная реакция на кератин	3,0-5,0	10^3	10^2	кератина по общему азоту, 95,0-98,0

ГЛАВА 6. Ассортимент и потребительские свойства препаратов и биоматериалов, полученных на основе фибриллярных белков

До недавнего времени возможности практического использования нативных солюбилизированных фибриллярных белков в ветеринарии, медицине, фармацевтике, косметологии и биотехнологии были весьма ограничены ввиду отсутствия налаженного производства такого рода препаратов. Многие разработки в этом направлении в нашей стране, так и за рубежом, носили экспериментальный характер. Тем не менее, интерес к этой проблеме не ослабевал, о чем свидетельствуют многочисленные публикации, посвященные, главным образом, коллагену (117, 125, 127, 136, 138, 153, 178, 225, 243, 245, 247, 271, 346, 364, 370, 373, 411, 412, 420) и демонстрирующие тесную зависимость между теоретическими достижениями и результатами чисто прикладного значения.

В связи с тем, что коллаген может быть наработан в виде золей, гелей, волокнистых структур, он чрезвычайно удобен для изготовления препаратов и биоматериалов различных форм и назначений. Немаловажное значение имеет тот факт, что этот биополимер не токсичен, практически не антигенен, обладает хорошим регенерирующим, гидратантным действием, способностью к комплексообразованию с биологически активными и лекарственными веществами, полностью лизируется организмом.

Препараты из коллагенового золя в зависимости от цели применения могут быть изготовлены в виде губок, мазей, порошков, гелей, растворов для инъекций, лабораторно-диагностических средств, гранул для культивирования и аффинной хроматографии.

Применение коллагена позволяет значительно улучшить свойства получаемых препаратов: пролонгировать их действие, снизить токсичность, уменьшить местную раздражающую реакцию при инъекционном введении, повысить терапевтический и диагностические эффекты, качество диагностики, увеличить сорбционную емкость сорбентов. Широкий спектр возможностей применения коллагена обусловлен его уникальной молекулярной структурой.

Наличие на поверхности коллагена большого количества функционально активных групп позволяет использовать его в качестве матрицы для иммобилизации препаратов самого разнообразного спектра действия. Выбор препарата определяется только целесообразностью улучшения его свойств совместимостью с коллагеном.

Ассортимент препаратов и биоматериалов на основе фибриллярных белков, полученных нами в ходе выполнения данной работы, представлен на рис.38.

6.1. Инъекционные формы препаратов на основе коллагена и характеристика их свойств

Для нас особый интерес представляло создание на основе коллагена препаратов с заданными свойствами для ветеринарии, медицины, биотехнологии, косметологии.

6.1.1. Антистрессовый состав - Аминакол

Учитывая потребности современного промышленного животноводства в антистрессовых препаратах длительного действия, опираясь на данные литературы (99, 100), а также используя собственный опыт, накопленный в этой области (88, 89, 91) мы предприняли попытку создать инъекционную форму аминазина, обладающую меньшей токсичностью и пролонгированным сроком действия, за счет иммобилизации его на уксуснорастворенном коллагене методом макромолекулярной комплексации, т.е. смешиванием лекарственного вещества непосредственно с коллагеном без применения сшивающих реагентов.

Однако в виду того, что при введении аминазин-коллагеновый комплекс оказывает сильно выраженный местный раздражающий эффект, очевидно, из-за присутствия уксусной кислоты в препарате, мы вынуждены были отказаться от использования в дальнейшей работе уксуснорастворенного коллагена для получения инъекционных форм иммобилизированных препаратов. Тем более, что он при взаимодействии с карбонатами крови оказывает токсическое

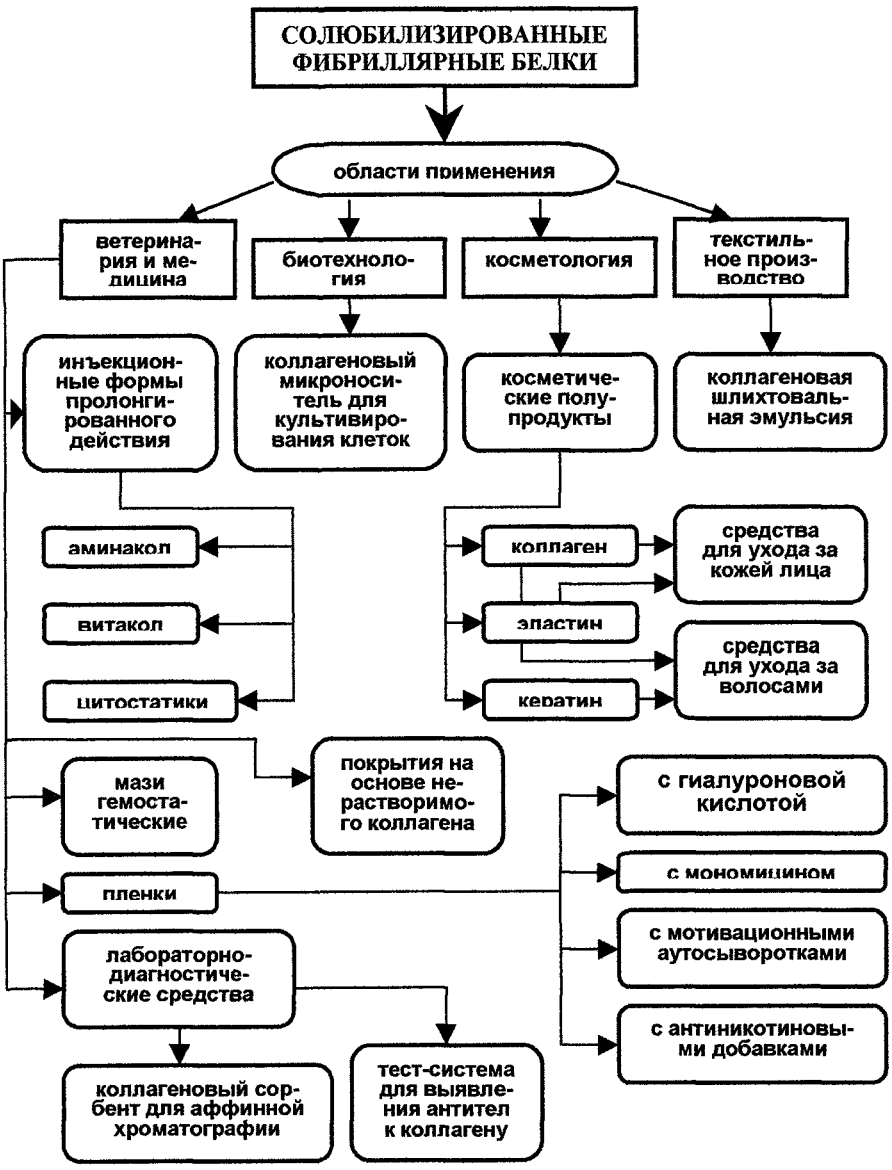


Рис.38. Ассортимент препаратов, полученных на основе фибриллярных белков при выполнении данной работы

действие на организм животных (100).

Учитывая тот факт, что нейралептики проявляют оптимальную фармакологическую эффективность в слабокислой среде (26), необходимо было подобрать реагент, с помощью которого можно было бы варьировать pH и который должен быть лишен недостатков, присущих уксусной кислоте.

Было сделано предположение, что аскорбиновая кислота в составе препаратов наряду с коллагеном должна способствовать снижению токсичности иммобилизуемых нейролептиков.

Для того чтобы выяснить способна ли аскорбиновая кислота полностью растворить коллагеновый гель, полученный после удаления из препарата уксусной кислоты, был поставлен эксперимент по оценке влияния соотношения коллагена и аскорбиновой кислоты на pH среды (табл.48).

Таблица 48

Изменение pH среды в зависимости от соотношения коллагена и аскорбиновой кислоты в растворе

Концентрация коллагена, %	Концентрация аскорбиновой кислоты, %					
	0,25	0,5	1,0	1,5	2,0	3,0
	pH среды					
0,5	4,7	4,0	4,0	3,1	2,85	2,45
0,75	6,0	5,4	4,7	4,35	4,0	3,65
1,0	6,8	6,15	5,2	4,7	4,3	3,25

Визуальные наблюдения показали, что при pH 6,8-5,4 дисперсия коллагена неоднородна в ней, наряду с жидкой фазой, имелись хлопья коллагенового геля в большем или меньшем количестве в зависимости от исходного содержания белка в образце, при pH 4,7 и ниже получали довольно однородный прозрачный раствор коллагена, вязкость которого находилась в прямой зави-

симости от его концентрации. По мнению (86), для повышения эффективности иммобилизации необходимо, чтобы носитель и лекарственное вещество имели противоположные заряды. Тогда за счет электростатического взаимодействия между ними полученный комплекс будет достаточно стабилен. Поэтому на основании анализа свойств аминазина и коллагена как амфотерного электролита (98), было сделано предположение о целесообразности проведения иммобилизации в интервале pH, находящемся ниже изоэлектрической точки коллагена.

При подборе оптимальных условий комплексообразования серьезное внимание было уделено изучению влияния концентрации носителя и действующего начала на степень их связывания (табл.49).

Таблица 49

Способность растворов коллагена разной концентрации адсорбировать аминазин

<table>
<tr><td rowspan="2">Содержание коллагена в растворе, %</td><td colspan="8">Содержание аминазина, мг/мл раствора</td></tr>
<tr><td>12,5</td><td>25,0</td><td>50,0</td><td>100,0</td><td>200,0</td><td>400,0</td><td>800,0</td><td>1000</td></tr>
<tr><td>0,5 (pH 5,0 и ниже)</td><td colspan="5">полное растворение и адсорбция</td><td colspan="3">препарат полностью не растворяется</td></tr>
<tr><td>1,0 (pH 5,0 и ниже)</td><td colspan="6">полное растворение и адсорбция препарата коллагеном</td><td colspan="2">препарат полностью не растворяется</td></tr>
<tr><td>2,0 (pH 6,8)</td><td colspan="2">полная адсорбция, но через несколько минут после смешивания наблюдается образование двух фаз: жидкой и гелеобразной</td><td colspan="6">полная адсорбция препарата коллагеном, с увеличением их концентрации гель становится прозрачнее и разжижается</td></tr>
</table>

Как видно из результатов, представленных в таблице, с увеличением концентрации раствора коллагена, используемого в качестве матрицы, растет и его адсорбционная емкость в отношении аминазина. Однако, учитывая тот факт, что лекарственный препарат, предназначенный для инъекций, должен

быть достаточно жидким и легко проходить через иглу шприца, использовали 0,5 % раствор коллагена. При этом насыщение коллагена наступает при соотношении 200 мг аминазина на 1 мл раствора.

При оценке стабильности полученного комплекса путем диализа его против воды и физиологического раствора при температуре 25°С установлено, что через 2-3 часа после его начала аминазин начинает постепенно вымываться из препарата, причем по мере увеличения pH, скорость вымывания возрастает. Несколько медленнее этот процесс проходил в том случае, когда в качестве диализата использовали физиологический раствор. Так, если в воде выявляли аминазин через 47 часов после начала диализа, то в физиологическом растворе следы его можно было обнаружить и через 52 часа.

По окончании диализа аминазин в препарате обнаружить уже не удавалось, то есть он вымывался полностью (табл.50).

Таблица 50

Содержание азота в анализируемых образцах до и после диализа

Объект исследования	Содержание азота в 1 мл препарата, г
Коллаген	0,089±0,002
Аминазин-коллагеновый комплекс: - до диализа - после диализа	 0,453±0,003 0,092±0.002

На основании этого был сделан вывод, что связь коллагена с аминазином непрочная, имеет нековалентный характер, поэтому при изменении условий, например pH среды, комплекс через определенное время распадается.

Оценка фармакологической активности полученного препарата, условно названного Аминакол, проводилось в сравнении с официнальным раствором аминазина, и была направлена как на исследование их токсичности, так и на изучение общего действия на организм животных.

Лабораторные исследования и производственная проверка препаратов в хозяйствах Московской области были выполнены совместно с сотрудниками кафедры и лаборатории фармакологии МВА Т.В.Ипполитовой и

В.П.Финником.

При изучении токсичности указанных препаратов, было установлено, что они вызывают резкое снижение двигательной активности вплоть до каталепсии, снижение тонуса мышц, потерю чувствительности, состояние угнетения, судороги.

Эти явления развивались через 15 и 30 минут, соответственно, после введения аминазина и аминакола. Так, введение аминазина в дозе 100 мг/кг живой массы вызывало на фоне развивающегося угнетения судороги смешанного типа (тонические и клонические), которые возникали с интервалом в 10-15 минут и продолжались в течение 3-5 минут. При применении аминакола судороги наблюдались, только начиная с дозы 800 мг/кг, что свидетельствует о меньшей токсичности препарата.

Этот вывод подтверждается также анализом количества летальных исходов при изменении токсических доз (рис.39).

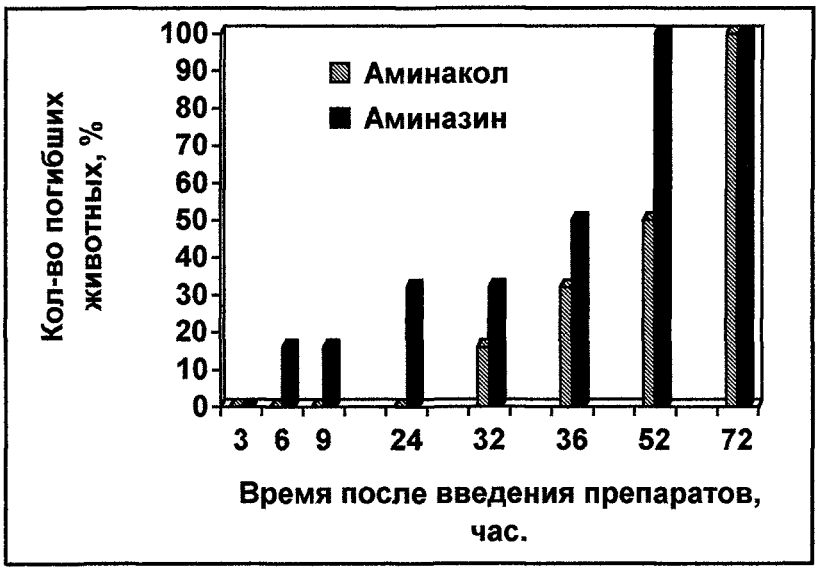


Рис.39. Динамика летальных исходов при использовании аминазина и аминакола (доза препаратов – 800 мг/кг живой массы)

Явления острой токсичности наблюдали у животных, которым вводили аминазин в дозе 1000 мг/кг, в случае использования аминакола подобный эффект выявляли только начиная с дозы 2000 мг/кг. Сравнительная оценка параметров острой токсичности обоих препаратов представленная в табл.51, наглядно демонстрирует преимущества аминакола.

Изучение общего действия препаратов в дозах от 25 до 200 мг/кг показало, что в первые 3-5 минут после введения препаратов животные находились в стадии возбуждения, затем наступала стадия угнетения, характеризующаяся снижением двигательной активности, тактильной и болевой чувствительности, тонуса скелетных мышц.

Таблица 51

Параметры острой токсичности аминазина (I) и аминакола (II)

Препарат	Анализируемые параметры		
	LD_{100}	LD_{50}	LD_{100} с латентным периодом
I II	1000 2000	838 1250	166 1121

Однако, следует отметить, что при одной и той же дозе действующего начала введение аминазина вызывает угнетение у животных уже через 5 минут, тогда как аминакол оказывает аналогичный эффект через 30 минут. Установлено также, что побочные эффекты от применения аминакола, в частности, нарушение координации движений, развивались в более поздние сроки, с меньшей интенсивностью, а восстановление проходило быстрее, чем при использовании аминазина.

Обобщая результаты проведенных экспериментов, следует подчеркнуть, что аминакол проявляет свое нейролептическое и транквилизирующее действие подобно чистому аминазину, однако проявление этого действия наступает на 15-30 минут позднее. Токсические и побочные явления, такие как судороги, расстройство координации движений и другие, развиваются в более отдаленные сроки и от больших доз. Общее действие препарата длительнее, эффект сохраняется до 72 часов.

Подобное действие препарата объясняется тем, что коллаген, обладая большей молекулярной массой, замедляет биотрансформацию аминазина, препятствуя его быстрому сульфоокислению, которое является причиной

кратковременности действия аминазина. Кроме того, наличие ионной связи между аминазином и коллагеном не только увеличивает время пребывания аминазина в организме в биологически активном состоянии, но и, что особенно важно, как считают (185, 186), уменьшает его токсичность.

Результаты тщательной лабораторной проверки послужили основанием для проведения производственных испытаний препарата как средства для профилактики транспортного стресса и адаптации к новым условиям кормления и содержания (57).

В ходе экспериментов, направленных на определение оптимальной инъекционной дозы аминакола установлено, что для противострессовой обработки телят целесообразнее применять аминакол, чем аминазин. Его следует вводить животным однократно в дозе 0,05 мл/кг за 20-30 минут до начала перевозки.

Проверка аминакола в условиях хозяйств, специализирующихся на откорме бычков, показала, что однократная обработка телят аминаколом предотвращает потерю массы у животных, предупреждает возникновение нежелательных изменений морфологических и биохимических показателей крови, вызванных перевозками, и приближает их к физиологической норме более выражено, чем использование аминазина в той же дозе (Приложение).

Таким образом, проверка препарата в условиях хозяйств, специализирующихся на откорме бычков, свидетельствует о том, что массовое применение аминакола может дать значительный экономический эффект. Лекарственный состав "Аминакол" запатентован (74), отмечен бронзовой медалью на выставке "Изобретательство и рационализация - 88" и рекомендован Госагропромом СССР для внедрения в сельскохозяйственное производство (54).

На основании проведенных экспериментов и производственных испытаний разработан комплект нормативно-технической документации, включающий технические условия на Аминакол для ветеринарии № 10.07.210-91 и временное Наставление по его применению, которые утверждены Главным управлением ветеринарии (1991 г.).

6.1.2. Комплексный витаминный препарат – Витакол

Весьма перспективным направлением в решении проблемы повышения общей резистентности организма животных, профилактики нарушений обмена веществ, в частности функционального состояния печени, является применение нейролептиков, транквилизаторов и адаптогенов, а также тканевых препаратов в сочетании с комплексом витаминов и др. биологически активных веществ.

К настоящему времени для нужд ветеринарной и зоотехнической практики, путем тщательного подбора отдельных компонентов, их соотношений и доз, разработаны различные лекарственные формы витаминов (99, 157).

Проводились определенные исследования по поиску оптимальной комбинации водорастворимых витаминов, которые в соответствующих дозах оказывали бы наиболее благоприятное влияние на организм животных, в частности, на нормализацию функции печени (100).

Однако до сих пор не разработана инъекционная форма комплекса водорастворимых витаминов группы В сочетании с аскорбиновой кислотой, обладающая пролонгированным действием, хотя препарат такого рода в силу своего композиционного состава, обладающий широким спектром биологического действия, был бы весьма полезен для активизации обменных и репаративных процессов, ускорения адаптации животных к влиянию вредных факторов внешней среды, профилактики и лечения гипо- и авитаминозов молодняка и маточного поголовья (99).

Достичь желаемого результата можно путем иммобилизации водорастворимых витаминов на коллагене. Будучи амфотерным полиэлектролитом и имея в своей структуре активные группы, он способен образовывать ионные связи в большом диапазоне pH. Значительная величина макромолекул позволяет ему соединиться с большим количеством молекул низкомолекулярных веществ.

В связи с тем, что коллаген относится к растворимым полимерам и подвергается в организме резорбции, сроки которой можно регулировать в широких

пределах, он постепенно высвобождает вещества, носителем которых является, что дает возможность длительное время поддерживать терапевтическую концентрацию препарата во внутренних средах и тканях организма (38).

Кроме того, коллаген обладает собственной полезной для организма биологической активностью. Для закрепления и пролонгирования положительного эффекта, оказываемого витаминным комплексом, содержащим аскорбиновую кислоту, тиамин, никотинамид, пиридоксин и рибофлавин в оптимально подобранных дозах, его иммобилизовали на коллагеновом носителе методом включения в цель, подобрав предварительную концентрацию коллагена, диапазон pH, условия комплексообразования каждого компонента с коллагеном и получения в конечном итоге стабильного препарата с заданными свойствами (А.С.СССР № 1508371). Лабораторно-экспериментальная апробация препарата проведена совместно с сотрудниками лаборатории фармакологии и токсикологии МВА Финником В.П. и лаборатории экспериментальной терапии ВИГИС.

Изучение полученного препарата на крысах при экспериментально вызванном гепатите, проведенное совместно с сотрудниками Всесоюзного института гельминтологии показало, что применение его оказывает защитное противострессовое действие, а также положительно влияет на степень накопления гликогена в печени, липидный обмен и уровень сахара в крови, причем эффект проявляется сильнее, чем при использовании водного раствора витаминов того же состава. Изучение параметров острой токсичности коллаген-витаминного комплекса, условно названного "Витакол", показало, что препарат не обладает кумулятивным эффектом, не проявляет эмбриотоксического и тератогенного действия. При апробации витакола в условиях производства было установлено, что введение его стельным коровам не только способствует улучшению биохимических показателей крови, но и благоприятно влияет на состояние новорожденных телят. Он стимулирует прирост живой массы на 23,4 %, повышает сохранность молодняка, способствует стабилизации основных биохимических показателей крови. Добавление витакола в рацион сель-

скохозяйственной птицы способствует улучшению обмена веществ, повышению продуктивности. Сохранность птицы повышается на 0,9 %, яйценоскость - на 5,6 %, прирост массы - на 13 % (Приложение).

Обобщая результаты проведенных исследований, следует отметить, что высокая эффективность витакола для животных обусловлена, на наш взгляд, не только действующим началом, т.е. витаминным комплексом, но и депонирующими свойствами коллагена как пролонгатора действия витаминов и как тканевого препарата.

На основании результатов, полученных в ходе описанных выше экспериментов, разработан комплект нормативно-технической документации, включающий технические условия на опытную партию витакола и временное наставление по его применению, утвержденные Департаментом ветеринарии Минсельхозпрода России 15.11.96 г.

6.1.3. Цитостатики различной химической природы, иммобилизованные на коллагене

Применение процессов иммобилизации для создания более стабильных форм быстро разрушающихся и теряющих свою активность лекарственных препаратов, многие из которых сами по себе токсичны для организма, но, тем не менее, назначаются в значительных дозах по жизненно важным показателям, весьма целесообразно при противоопухолевой терапии.

Следует отметить, что применение коллагена в данном случае может дать положительный двойной эффект, так как этот белок в силу своих физиологических и функциональных особенностей представляет собой барьер пролиферации опухолевых клеток и обкалывание им опухолей препятствует возникновению метастазов, а также ведет к фенотипической нормализации трансформированных клеток (11).

Совместно с сотрудниками экспериментальной клиники Московского научно-исследовательского онкологического института им. П.А.Герцена нами были проведены работы по созданию иммобилизованных инъекционных форм цитостатиков различной химической природы (платидиама, циклофос-

фана и 5-фторурацила) на коллагеновом носителе и по экспериментальному изучению их на лабораторных животных. Оценка стабильности полученных комплексов по сравнению с водными растворами цитостатиков, проведенная in vitro методом диализа показала, что высвобождение действующего начала из иммобилизованных форм препаратов происходит в 4-5 раз медленнее, чем из не иммобилизованных. В экспериментах in vivo показано (рис.40), что использование его в качестве матрицы снижает острую токсичность иммобилизованных форм платидиама и 5-фторурацила на 8,9 и 25,8 % соответственно, позволяет увеличить продолжительность жизни подопытных животных на 1сутки при введении высоких доз цитостатиков, а также при перевивке им карциномы РС-1.

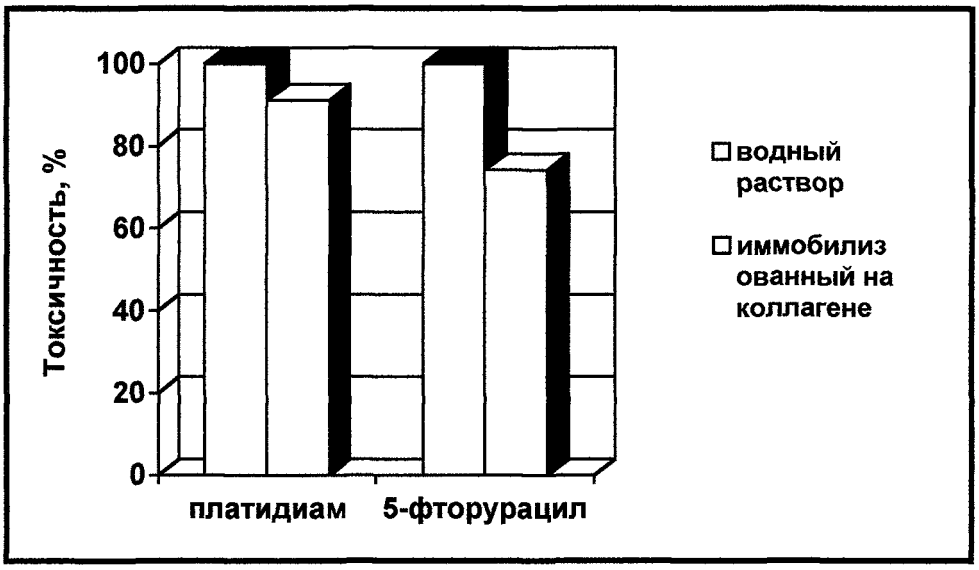


Рис.40. Влияние коллагена на токсичность цитостатиков

Однако их существенного влияния на рост карциномы РС-1 не обнаружено.

Полученные результаты свидетельствуют о принципиальной возможности использования коллагена для снижения токсичности цитостатиков и пролонгирования сроков их терапевтического действия (125).

Согласно полученному заключению, полученные лекарственные формы перспективны и требуют проведения дальнейшей проверки.

6.2. Мази на основе коллагена и характеристика их свойств

Наряду с созданием инъекционных лекарственных форм пролонгированного действия на основе растворенного коллагена были проведены исследования, направленные на разработку лекарственной формы в виде мази, обладающей стабильным гемостатическим, репаративным антисептическим действием.

Разработка методов надежного местного гемостаза очень актуальна для ветеринарной и медицинской хирургической практики. Использование коллагена для этих целей представляет определенный интерес с учетом его роли в процессах заживления ран (38), адгезии клеток (84,177, 184), а также способности связываться с тромбоцитами и вызывать их агрегацию (71). На наш взгляд, оптимальным гемостатическим материалом следует считать коллагеновые губки, полностью отвечающие требованиям, предъявляемым к гемостатическим препаратам. Они хорошо зарекомендовали себя и в ветеринарной практике (44, 48).

Однако в силу объективных причин налаженного промышленного выпуска коллагеновых губок как лекарственной формы практически не существует. По нашему мнению, в качестве альтернативного варианта в данном случае можно применять коллагеновые мази, способ получения которых не требует использования такого дорогостоящего оборудования, как при наработке коллагеновых губок. Кроме того, такая лекарственная форма очень удобна для остановки кровотечений у животных, так как позволяет создать надежный гемостаз, предотвратить инфицирование раны.

В качестве основного действующего начала нами была использована гелеобразная коллагеновая масса, полученная из спилковой обрези крупного рогатого скота в результате щелочно-солевой обработки, нейтрализации, промывки, механического диспергирования и фильтрования, содержала около 4 % сухих веществ, доля коллагена из них составляла примерно 99 %.

Гемостатические свойства чистого коллагена были усилены за счет включения в коллагеновый золь эпсилон-аминокапроновой кислоты в количестве, достаточном для остановки артериального кровотечения за 30-60 сек. Для

придания препарату антисептических свойств в него добавляли борную кислоту, при необходимости вводили антибиотик.

Мазь готовили, объединяя полученный комплексный препарат с подобранной с учетом реологических показателей пластической основой, представляющей собой смесь ланолина и вазелина, после чего стерилизовали γ-облучением. Экспериментальная апробация, проведенная в клинике кафедры оперативной хирургии МВА, а также в лор-клинике РГМУ, показала, что разработанная лекарственная форма обеспечивает быструю и надежную остановку кровотечения, не оказывает раздражающего действия в зоне применения, профилактирует возникновение послеоперационных осложнений, сокращает сроки заживления ран (136, 153, 154).

На основании полученных результатов разработана и предлагается технологическая схема получения коллагеновой гемостатической мази (рис.41).

6.3. Пленки на основе коллагена и характеристика их свойств

Неоспоримое удобство препаратов направленного действия на основе коллагена заключатся в возможности их наработки в заранее заданной, с учетом практического использования, форме. Так, когда возникает необходимость продлить срок действия препарата для аппликационного применения, в ряде случаев целесообразнее использовать такую лекарственную форму как пленка, поскольку она обладает определенными преимуществами перед другими лекарственными формами, например, мазями (38, 42, 201).

Разработанные нами способы иммобилизации на коллагене лекарственных и биологически активных веществ различной химической природы (антибиотиков, в частности мономицина, мотивационных сывороток, содержащих антивированные нейропептиды, полисахаридов, например, гиалуроновой кислоты, солей серебра и др.) с последующей отливкой из таких композиционных составов пленок дали возможность получить лекарственную форму, удобную для применения в офтальмологии, спортивной медицине, оториноларингологии (13, 126, 127, 134, 138, 154). Введение сшивающих агентов позволяет регулировать сроки лизиса таких пленок. Следует отметить, что во

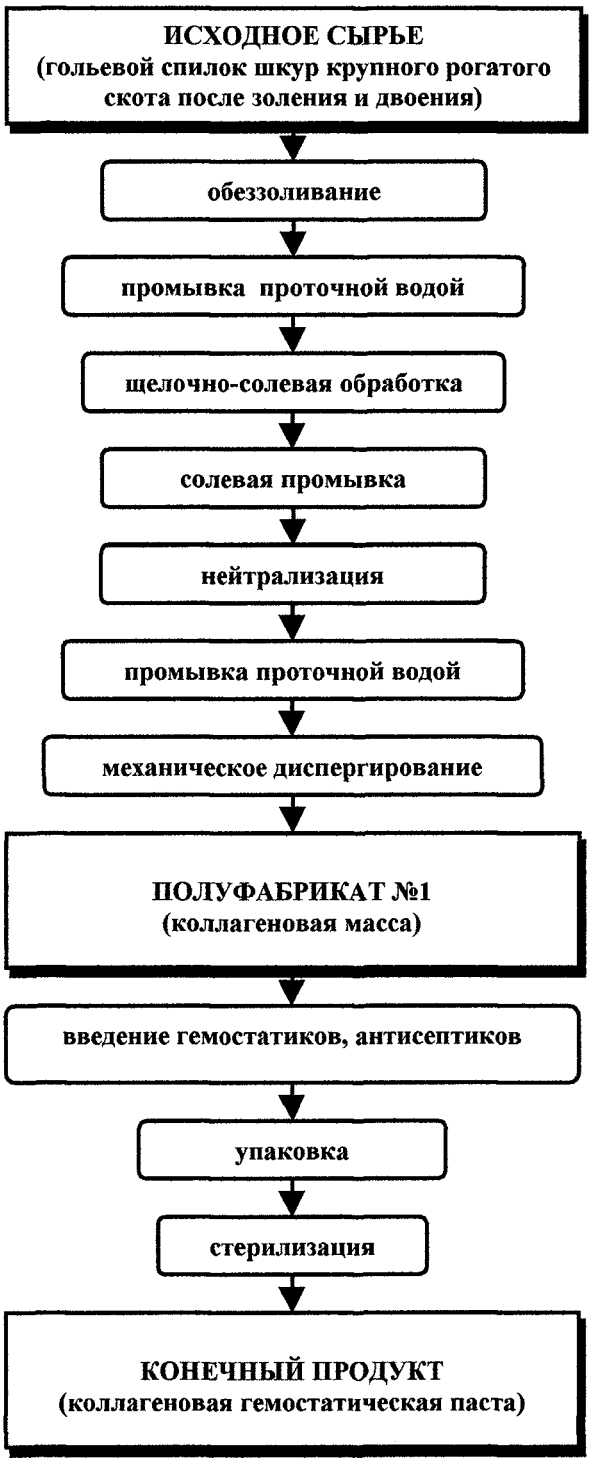


Рис.41. Технологическая схема получения гемостатической мази на основе коллагена

всех случаях коллаген не только улучшает свойства иммобилизуемых веществ, но и как уже неоднократно подчеркивалось, сам оказывает благоприятное воздействие на организм.

Процесс получения лекарственной формы в виде пленки всегда начинается с наработки коллагеновой основы и контроля ее качества. Технология получения обработана таким образом, что в конечном продукте практически полностью отсутствуют биополимеры неколлагеновой природы, а содержание коллагена должно составлять 97,0-98,0 % от массы сухого остатка.

Что касается процедуры комплексообразования коллагена с определенным лекарственным или биологическим веществом, то в каждом конкретном случае необходимо заново вести поиск оптимальных условий для получения стабильного комплекса, учитывая при этом pH среды, ионную силу, возможный характер взаимодействия, который может быть электростатическим, адсорбционным или клатратным. Особенно важно, чтобы в процессе комплексообразования не произошло блокировки коллагена реакционных групп препарата, ответственных за его специфическую активность. Процесс пленкообразования зависит от параметров исходного раствора коллагена. Технологически он легко осуществим. При сушке на воздухе композитных составов в условиях, исключающих денатурацию коллагена (температура не должна быть выше 30 ^{0}C), можно получать плотные, прозрачные, достаточно эластичные, благодаря добавлению пластификатора, пленки. Толщина их зависит, главным образом, от концентрации раствора коллагена и толщины налитого в кюветы слоя. В процессе сушки по мере удаления растворителя повышается концентрация биополимера, усиливается взаимное притяжение его молекул и молекул лекарственного вещества и в результате образуется внешне монолитная плотная пленка.

Немаловажное значение при этом имеет правильное определение сорбционной емкости коллагена. Ввиду того, что конечный продукт представляет собой пленку, лекарственный препарат не должен выкристаллизовываться на ее поверхности, во избежание этого максимально допустимую концентрацию

иммобилизуемого препарата следует предварительно подбирать по отношению к сухой массе коллагена.

С биофармацевтической точки зрения терапевтическая эффективность лекарства определяется многими факторами, но в первую очередь способностью его высвобождения из лекарственной формы (86, 186).

Использование метода диализа позволяет проследить динамику высвобождения активного начала из пленочных коллагеновых форм. Скорость нарастания и длительность сохранения концентрации препарата в диализате зависит от способа его иммобилизации на коллагене, который, как известно, (86) может быть физическим или химическим. Однако, независимо от этого пролонгирующий эффект имеет место в любом случае, изменяется только степень его выраженности.

Пролонгирующий эффект объясняется равномерным распределением сравнительно малых молекул лекарственных и биологически активных веществ между макромолекулами коллагена и с постепенным освобождением их как за счет диффузии, так и медленного лизиса коллагена. Изложенные выше принципы приготовления композитных составов и получения пленок были использованы нами при создании пролонгированных форм некоторых препаратов пролонгированного действия.

6.3.1. Пленки с антибиотиками

В настоящее время для лечения кератоконъюнктивитов крупного рогатого скота широко используют водный раствор мономицина. Однако это лекарственное вещество быстро всасывается тканями глаза и оказывает кратковременный антимикробный эффект.

Чтобы продлить срок антибактериальной активности мономицина, его в заранее подобранной дозе диспергировали в коллагеновой основе в присутствии контрастного вещества и пластификатора.

Учитывая тот факт, что антимикробные коллагеновые пленки должны обладать определенной структурной прочностью, устойчивостью к действию ферментов слезной жидкости, в состав пленкообразующей смеси вводили так-

же дубитель. Было установлено, что количество введенного в пленку дубящего вещества оказывает существенное влияние на стабилизацию ее внутренней структуры. На это указывало увеличение температуры сваривания исследуемых образцов. Полученные результаты не только позволили выбрать оптимальную концентрацию дубителя, но и послужили основой для исследований, направленных на изучение сроков лизиса пленок в организме.

В ходе проверки ферментативной устойчивости пленок были проанализированы также образцы, не содержащие дубитель, и глазные пленки из синтетического полимера, выпускаемые в настоящее время медицинской промышленностью для лечения кератоконъюнктивитов.

Результаты эксперимента показали, что под действием ферментов слезной жидкости антимикробная коллагеновая пленка, содержащая дубитель, растворяется за 7,5 ч, пленка без дубителя - за 4 ч, полимерная пленка - за 1 ч, и тем самым подтвердили целесообразность введения сшивающего агента в состав пленки.

С учетом вышеизложенного, нами была приготовлена лабораторная серия коллагеновых пленок для клинических испытаний. Для сравнения физико-химических показателей проанализирована глазная пленка из полимерного материала. Плотность коллагеновой пленки составила 0,50 г/см^3, толщина - 0,25 мм, $T_{св}$ - 45 ^{0}C, полимерной - соответственно 0,123 г/см^3; 0,35 мм; 33^{0}C. Как видно из приведенных цифр, полученная пленка лучше, чем полимерная: она тоньше, имеет большую кажущуюся плотность, обладает большей гидротермической устойчивостью и, следовательно, более длительным терапевтическим эффектом.

Результаты испытания коллагеновых антимикробных пленок на животных, больных кератоконъюнктивитом, показали, что при введении в конъюнктивальную полость они быстро смачиваются слезной жидкостью и через 10-15 сек. становятся эластичными; через 3-4 ч происходит частичное деформирование краев пленки; через 6 ч она превращается в вязкий сгусток; через 7 ч в конъюнктивальной полости можно обнаружить лишь отдельные фрагменты

пленки; через 8 ч она полностью растворяется. После однократного применения пленок у животных на следующий день резко уменьшались слезотечение, выделение гнойного экссудата, отек роговицы.

Синтетические полимерные пленки оказались менее эффективными, срок их действия был в 7 раз меньше, чем коллагеновых. Кроме того, быстрое рассасывание синтетической пленки вело к поступлению в конъюнктивальную полость большого количества препарата, и избыток его, не будучи в состоянии сорбироваться тканями глаза, частично выливался через нижнее веко, частично проникал в слезно-носовой канал, вызывая раздражение слизистых оболочек.

Полученные результаты свидетельствуют о преимуществе пленок на основе природного биополимера коллагена по сравнению с пленкой из синтетического полимера, а также растворами антибиотиков, используемыми в настоящее время для лечения кератоконъюнктивитов (134).

6.3.2. Пленки с гиалуроновой кислотой

Следует отметить, что в стабилизации, пролонгировании срока действия нуждаются не только лекарственные, но и биологически активные вещества. В частности, вышесказанное полностью относится к гиалуроновой кислоте - биополимеру углеводной природы, наряду с коллагеном входящему в состав соединительной ткани и выполняющему в организме различные жизненноважные функции.

Гиалуроновая кислота (ГК), высокомолекулярный, линейный полисахарид, в настоящее время применяется в дерматологии, косметологии и офтальмологии в качестве средства для удержания влаги, а также для пролонгации действия различных лекарственных веществ.

Кроме того, она выполняет роль неспецифического стимулятора иммунитета, способствует повышению естественной резистентности организма, благодаря чему используется при лечении воспалительных процессов, для заживления ран и в онкологической практике (107, 156).

В связи с тем, что водные растворы гиалуроновой кислоты обладают низ-

кой устойчивостью вследствие быстрой деполимеризации этого полисахарида (158), изучена возможность его иммобилизации его на коллагене с целью создания стабильной лекарственной формы препарата в виде пленки. При этом предполагалось, что такая композиция позволит не только стабилизировать гиалуроновую кислоту, но и добиться более высокого терапевтического действия препарата за счет синергизма, входящих в него ингредиентов.

Для реализации поставленной задачи была проведена серия экспериментов, направленных на подбор оптимального соотношения компонентов в пленкообразующей смеси и условий комплексообразования в широком диапазоне pH и при различных температурно-временных режимах. Иммобилизацию ГК на коллагеновом носителе проводили методом включения в гель с добавлением пластификатора. Полученную смесь заливали в кюветы с полиэтиленовой подложкой слоем не более 0,5см и сушили при комнатной температуре. С целью регулирования сроков лизиса пленок сшивающий агент добавляли непосредственно в композиционную смесь перед отливкой пленок или выдерживали готовую пленку в парах дубителя. На основании проведенных исследований разработана технологическая схема получения коллагеновых пленок, содержащих ГК, в соответствии с которой наработано несколько партий таких пленок. Они имели следующие показатели: толщина - 55-60 мкм, плотность - 0,49-0,51 г/см^3, гидротермическая устойчивость - 55-56 ^{0}C, влагоемкость - 58,3-60,1 %, время рассасывания под действием фермента - 64-71 ч, устойчивость на изгиб - 4,0-4,5 балла, pH водной вытяжки - 7,0-7,2. Апробация пленок как средства для лечения кератоконъюнктивитов показала, что при введении под веко, они быстро смачивались слезной жидкостью, медленно лизировались, выделяя ГК. Уже на следующий день после однократного применения пленки резко уменьшалось слезотечение, выделение гнойного экссудата, отек. Водный раствор ГК дает тот же терапевтический эффект только на третьи сутки. Проведенные эксперименты свидетельствуют о перспективности новой лекарственной формы ГК в виде пленки, содержащей коллаген в качестве основы и о широких возможностях, которые может дать реализация проекта по

созданию биоматериалов с регулируемой структурной стабильностью и скоростью резорбции (126). Подобные препараты представляют собой новое поколение дюрантных фармацевтических средств.

6.3.3. Пленки с нейропептидами

По договору о сотрудничестве с Научно-учебным центром проблем жизнедеятельности человека нами были проведены исследования по получению и апробации коллагеновых пленок, содержащих стимулирующую аутосыворотку крови человека, обладающую миогенным и сонмогенным действием.

В спортивной медицине известно использование биорегуляторно-мотивационных комплексов, чаще всего гормонально-нейропептидной природы, получаемых из крови доноров, предварительно подвергнутых определенной функциональной нагрузке.

К этой группе биологически активных веществ относится миогенная сыворотка, обладающая общестимулирующим эффектом и улучшающая физическую работоспособность, и сонмогенная сыворотка, обладающая эффектом улучшения структуры нормального сна и устранения бессонницы. Способ получения такого рода препаратов разработан и запатентован Шестаковым В.А. с соавторами (181).

Однако в силу определенных причин спортсмены неохотно идут на внутримышечные или внутривенные инъекции препаратов, полученных из собственной крови, тем более что направленный физиологический эффект от их применения кратковременен, а повышение эффективности препарата за счет увеличения дозы не перспективно при всех способах введения, так как объем не может увеличиваться до бесконечности. Следует отметить, что хотя препараты не являются допинговыми, они повышают функциональные резервы организма. Кроме того, после введения их невозможно обнаружить в крови и в моче, т.к. они получены из аутокрови.

В поисках более удобной в применении лекарственной формы нами была предложена рецептура композиционной смеси, в состав которой входили коллаген в качестве матрицы, действующее начало (сыворотки), ряд других до-

бавок, в том числе и вкусовых, а также консервант пищевого класса, отработаны условия иммобилизации сывороток на коллагеновом носителе и получения пленок для сублингвального использования.

В ходе испытаний, проведенных на 6 группах спортсменов-боксеров, которые получали сомногенные и миогенные аутосыворотки в виде инъекций и в виде пленок сублингвально, установлено, что коллагеновые пленки, содержащие биостимулирующие мотивационные аутосыворотки, представляют собой более удобную в применении лекарственную форму, они препятствуют быстрой инактивации активного начала и пролонгируют физиологический эффект от введения препаратов до 3-х суток, дают возможность сохранить стабильность препаратов при хранении до 6-ти месяцев (срок наблюдения), уменьшить дозу и частоту их введения. При этом патологических изменений со стороны ЭКГ, клинического анализа крови и мочи у спортсменов отмечено не было.

Предложенная лекарственная форма рекомендована для более широкой спортивно-практической апробации и внедрена в практику подготовки спортсменов сборной СССР по боксу (Приложение).

Наряду с описанными выше экспериментами, сравнительная оценка эффективности различных лекарственных форм эргомиогенной сыворотки, в том числе и в виде содержащей ее коллагеновой пленки, была проведена также на 25 добровольцах с нормальным слухом и 20 больных с нейросенсорной тугоухостью. При этом установлено, что сублингвальное применение препарата вызывает более пролонгированное и стабильное повышение остроты слуха, чем это имеет место при внутримышечных инъекциях (13).

6.3.4. Пленки с антиникотиновой добавкой.

Преимущества использования коллагена в качестве основы для получения пленок для сублингвального применения были подтверждены в экспериментах по созданию профилактического антиникотинового препарата.

Курение - одна из наиболее вредных привычек, крайне опасных для здоровья человека. Поэтому разработка новых подходов и методов борьбы с ни-

котиновой зависимостью представляет собой весьма актуальную задачу. Одним из средств, вызывающих отвращение к курению, является водный раствор азотнокислого серебра, который используют в виде полоскания. В виду того, что препарат быстро разрушается на свету, для сохранения его активности и создания более удобной в применении лекарственной формы проведены исследования по иммобилизации азотнокислого серебра на коллагене. В результате получена композиционная смесь с оптимальным соотношением действующего начала, носителя и некоторых других добавок, из которой отливали пленки. Испытания пленок, каждая из которых содержала одну лечебную дозу азотнокислого серебра, на добровольцах показали, что их регулярное применение незадолго до курения при попытке закурить вызывает крайне неприятные и более продолжительных ощущения, чем полоскание водным раствором азотнокислого серебра и, в конечном итоге, способствует выработке более устойчивого антиникотинового рефлекса (127).

Обобщая результаты, полученные в ходе проведенных многоплановых исследований по изучению взаимодействия коллагена с лекарственными и биологически активными веществами и оценка возможностей использования иммобилизированных биопрепаратов в ветеринарной практике, следует отметить, что применение коллагена в качестве инертной белковой высокомолекулярной матрицы позволяет создавать лекарственные формы, благодаря которым можно длительное время поддерживать терапевтические концентрации того или иного препарата во внутренних средах и тканях организма, уменьшать дозы и частоту введения лекарств, защитить ткани от их раздражающего или токсического действия.

Технологическая схема получения различных лекарственных форм дюрантных фармацевтических средств на основе коллагена представлена на рис.42.

Данное направление открывает путь к созданию нового поколения фармацевтических препаратов.

Диапазон областей применения коллагена, обусловленный уникальными

Рис.42. Технологическая схема получения препаратов пролонгированного действия на основе коллагена

структурными особенностями и свойствами этого биополимера, постоянно расширяется.

6.4. Коллаген как микроноситель для культивирования клеток

Тот факт, что коллаген будучи гликопротеидом внеклеточного матрикса, является еще и компонентом надмембранного слоя клеточной поверхности, участвует в процессах адгезии клеток и распластывании их на подложке (8, 84, 211, 212) позволяет предположить, что этот биополимер можно с успехом использовать в биотехнологии в качестве микроносителя для псевдосуспензионного культивирования субстратзависимых клеток млекопитающих при производстве вирусных вакцин, а также как сорбент для аффинной хроматографии.

Вопросам получения микроносителей и культивирования на них клеток посвящено достаточно много публикаций, среди которых для более детального анализа был отобран ряд статей и патентных документов (96, 168, 175, 225, 249), касающихся применения для указанных выше целей сополимеров стирола, сефадекса, ДЭАЭ-целлюлозы, желатина и коллагена.

Следует отметить, что многие виды исходного сырья, для производства микроносителей, в настоящее время уже не выпускаются, иные крайне дороги, некоторые из них (например, бромциан-сефароза) могут быть токсичны для клеток.

По нашему мнению, желатин представляет собой достаточно технологичный вид сырья для наработки микроносителей. Однако не следует забывать, что он широко применяется в пищевой, фотопромышленности и некоторых других отраслях народного хозяйства. Поэтому его целесообразно использовать по прямому назначению, по крайней мере, в тех случаях, когда он имеет высокую степень очистки.

К недостаткам описанных в литературе методов получения микроносителей следует отнести также высокую себестоимость конечного продукта за счет использования дорогостоящих реактивов. Кроме того, получаемые согласно указанным выше техническим решениям конечные продукты пред-

ставляют собой разнокалиберные частицы чаще всего неправильной формы, что значительно снижает эффективность их использования.

Учитывая тот факт, что желатин по своим физико-химическим показателям близок к денатурированному коллагену, мы предприняли попытку разработать способ получения микроносителей из коллагена, используя для этого в качестве исходного сырья недубленые отходы кожевенного производства, в частности, гольевую спилковую обрезь шкур крупного рогатого скота.

Последовательная обработка данного вида отходов щелочно-солевым и нейтрализующим растворами позволила получить полуфабрикат в виде нейтральной коллагеновой массы. Несмотря на то, что этот продукт обладал плотной консистенцией, получить стабильные гранулы не удалось, т.к. содержание сухого остатка в анализируемых образцах не превышало 2 %.

Упаривание при температуре не выше 60 ^{0}С позволило сконцентрировать образец в 10 раз. После такой процедуры содержание сухого остатка в образце составило уже 20,8-22,4 %, причем на 98 % он состоял из белковых веществ, главным образом, из частично-денатурированного коллагена.

Как известно, качество любого целевого продукта, и особенно, биологического происхождения и назначения, во многом зависит не только от свойств исходного сырья, а также от того, насколько эффективно решены технические проблемы, связанные с аппаратурным оформлением технологического процесса и строгим соблюдением оптимальным режимов отдельных операций на всех стадиях технологической обработки.

Следующий этап работы заключался в получении гранул определенного размера, несущих определенный электрический заряд. Как известно, гранулы сферической формы можно получить путем механического перемешивания двухфазной смеси, состоящей из полярной и неполярной жидкостей (195).

В качестве дисперсионной среды были использованы охлажденные жидкие углеводороды, в частности, вазелиновое масло, а дисперсной фазы - подогретый денатурированный коллаген.

Струю коллагена впрыскивают под давлением через металлическое сопло

диаметром 0,3-0,5 мм в масло, перемешивая образующуюся двухфазную смесь за счет акустических мелкомасштабных вихрей, создаваемых низкочастотным ультразвуковым воздействием (22 или 44 Кгц). При этом ее электризуют, для чего на корпус металлического сопла подают электрический потенциал того или иного знака, величиной от 16 до 30 кВ. В результате струя легко распадается на сферические микрокапли одинакового заряда размером 5-50 мкм, которые благодаря одноименному электрическому заряду, взаимно отталкиваются и не образуют более крупных частиц за счет чего существенно увеличивается эффективная поверхность, к которой могут прикрепляться клетки, молекулы ферментов и других веществ, требующие иммобилизации.

После инжектирования коллагеновой массы в масло и перемешивания, смесь охлаждают до 4 ^{0}C, образовавшиеся гранулы обезжиривают смесью бутанол-этиловый эфир (1:1, V:V), задубливают глутаровым альдегидом, а затем активированную глутаром поверхность гранул покрывают нативным коллагеном, инкубируя частицы в растворе 0,5-0,8 % коллагена с pH 5,2-5,4 в течение 3-4 часов при 25-27 ^{0}C. После этого частицы микроносителя подвергают серии последовательных обработок с целью отмывки от несвязавшегося коллагена, блокировки свободных альдегидных групп на поверхности гранул, а затем автоклавируют, после чего он пригоден для использования.

Следует отметить, что существует ряд особенностей, которые необходимо учитывать при получении микроносителей. Так, было установлено, что интенсивность перемешивания влияет на размер гранул, особенно в том случае, когда нет возможности использовать ультразвук. Например, получить гранулы диаметром менее 100 мкм, при механическом диспергировании, возможно лишь при скорости вращения пропеллерной мешалки 1500 об/мин.

Немаловажное значение имеет также температура дисперсионной среды. Было показано, что чем она ниже, тем быстрее заканчивается процесс структурирования коллагеновой гранулы.

В связи с жесткими требованиями, предъявляемыми к поверхности микроносителя, серьезное внимание должно быть уделено процедуре обезжирива-

ния гранул. Результаты исследований по выбору реагента, обладающего наилучшим обезжиривающим действием, представлены в табл.52.

Таблица 52

Влияние различных реагентов на полноту обезжиривания коллагеновых гранул

Используемый реагент	Содержание жира в анализируемых образцах, %				
	до обезжиривания	после обработки со сменой раствора			
		однократной	двукратной	трехкратной	четырехкратной
Петролейный эфир	10,36±0,43	5,30±0,34	0,30±0,03	—	—
Бутанол	- " -	6,40±0,48	1,30±0,08	0,90±0,05	0,100±0,009
Бутанол + этиловый эфир	- " -	5,80±0,41	0,50±0,01	0,20±0,01	—
ПАВ	- " -	7,30±0,51	5,10±0,35	4,30±0,20	3,20±0,20
Мыльный спирт	- " -	7,00±0,49	4,60±0,25	3,10±0,28	2,60±0,19

Как видно из табл.52, наиболее быстро и эффективно можно обезжирить гранулы с помощью петролейного эфира, бутанола и смеси бутанол с этиловым эфиром в соотношении 1:1 (V:V). Так например, уже после трехкратной 15-минутной отмывки гранул петролейным эфиром не удается обнаружить и следов масла на их поверхности. Тем не менее, в последующей работе мы вынуждены были отказаться от использования этого реагента в виду его "нетехнологичности" (он летуч, пожароопасен, токсичен). Стабильным обезжиривающим эффектом обладает и бутанол. Однако для промывки гранул требуется в 2-3 раза больше времени. Наиболее приемлемым для этих целей реагентом, обладающим не только обезжиривающим, но и обезвоживающим действием, на наш взгляд, является смесь бутанола и этилового эфира в соотношении 1:1 (V:V). Остальные обезжиривающие средства для отмывки гранул от масла оказались менее пригодны, так как не полностью удаляли масляную пленку с поверхности гранул, что затрудняло их дальнейшую обработку и последующее использование.

Двукратная обработка обезжиренных гранул коллагенового микроносителя глутаровым альдегидом в нарастающих концентрациях дает, на наш взгляд, двойной эффект. Во-первых, она способствует равномерной, прочной "сшивке" внутренней структуры гранул, что позволяет стерилизовать их с помощью автоклавирования без ущерба для формы частиц. Во-вторых, последующая инкубация гранул поперечно сшитого денатурированного коллагена в растворе нативного коллагена ведет к блокировке всех свободных альдегидных групп, имеющихся на поверхности частиц, молекулами белка, что в конечном итоге позволяет получить матрицу сферической формы с иммобилизованным на ее поверхности нативным коллагеном.

Проведенные исследования позволили выбрать наиболее оптимальные режимы отдельных технологических операций и объединить их в единый технологический цикл (рис.43). Новизна, промышленная применимость и изобретательский уровень предложенного технического решения защищены патентом РФ № 2007451 (174).

По внешнему виду конечный продукт, получаемый согласно разработанной нами технологии, представляет собой сферически прозрачные частицы желтовато-коричневого цвета (рис.44).

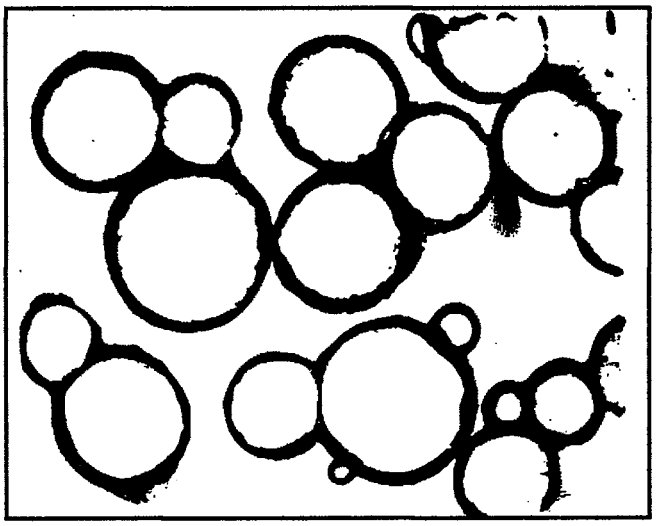


Рис. 44. Внешний вид коллагеновых микроносителей

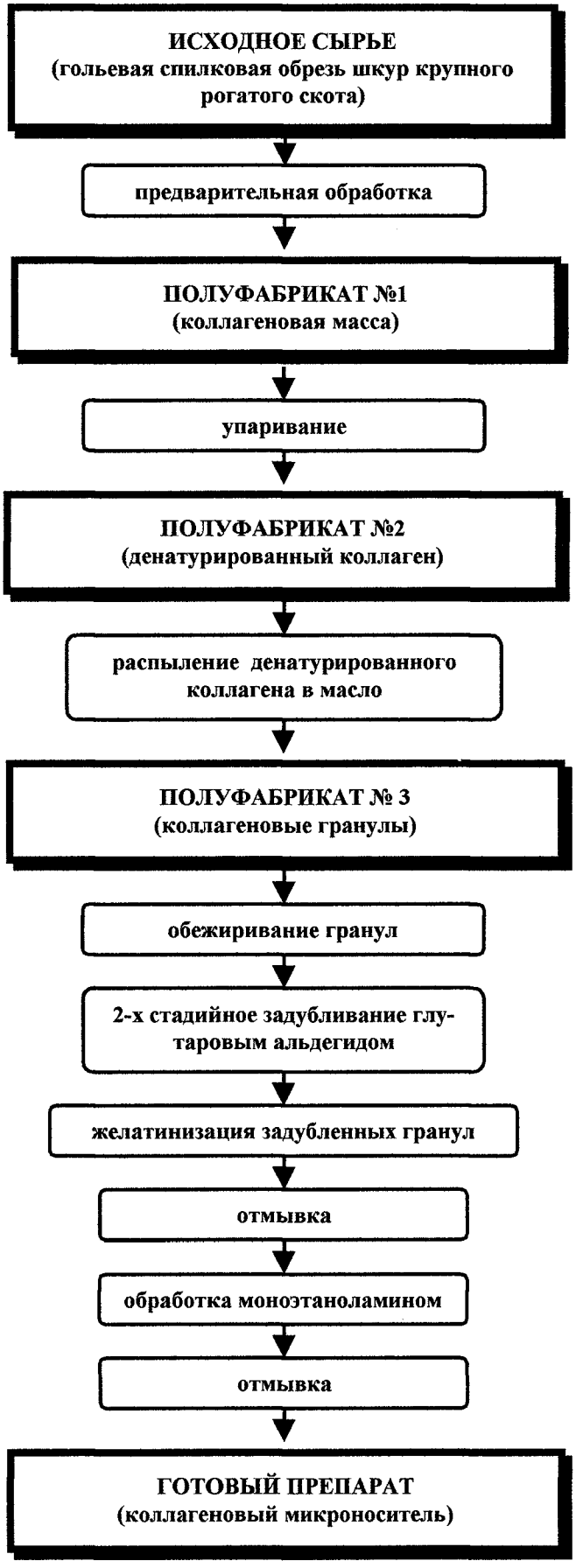


Рис.43. Технологическая схема получения коллагенового микроносителя

Результаты опытов по определению физико-химических параметров и, соответственно, биологической активности экспериментальных серий коллагенового микроносителя, условно названного нами Цитокол, обобщены и представлены в табл. 53.

Как видно из представленных в табл. 53 данных, скорость седиментации гранул микроносителя возрастает с увеличением размера гранул (коэффициент корреляции r = 0,86-0,89). Что касается плотности гранул, то она одинакова для частиц любого размера.

Очень важным параметром, характеризующим технологические возможности микроносителя как субстрата для прикрепления клеток, является площадь ростовой поверхности 1 мл^3 гидратированных гранул, определенная расчетным путем для каждой серии микроносителя.

Очевидно, что чем больше площадь ростовой поверхности, тем большую клеточную массу можно получить в процессе культивирования.

Как видно из табл.53, существует обратная зависимость между размером частиц микроносителя и площадью ростовой поверхности. При выборе опти - мальной фракции микроносителя необходимо учитывать то обстоятельство, что для нормальной адгезии и пролиферации клеток необходимо, чтобы размер частиц микроносителя был больше размера клетки не менее, чем в 100 раз.

Для характеристики микроносителя важно знать имеют ли его частицы электрический потенциал, его величину и знак заряда. Эти показатели играют немаловажную роль в связи с тем, что клетки перевиваемых культур имеют слабый отрицательный заряд, и для хорошей их адгезии микроноситель должен быть заряжен положительно.

С целью получения вышеуказанной информации, определяли электрохимический потенциал частиц микроносителя по скорости их движения в электрическом поле электрофоретической камеры. Установлено, что гранулы имеют положительный заряд, а их электрокинетический потенциал колеблется от 7,3 до 10,6 мВольт.

Как видно из табл.53, наилучшая адгезия клеток линии Таурус-1 (Т-1),

Таблица 53

Сравнительная оценка физико-химических и биологических свойств экспериментальных серий коллагенового микроносителя

№ серии	Диаметр частиц, 10^{-5} (ср.значения)	Скорость седиментации, 10^{-2} м/сек	Удельная масса 10^3 кг/м^3	Общая площадь ростовой поверхности 1 мл гидратированных гранул, м^2	Заряд частиц	Адгезивная активность (% прикрепления клеток через 12 часов)	Время образования монослоя, сутки	Кратность прироста клеток (через 5 дней)	Время перевивания клеток, сутки
1	10,0	0,21	1,1180	0,19	отсутствует	70	5-6	3-4	10-12
2	5,0	0,15	1,1180	0,38	—	62	5 – 6	2 – 3	15-17
					+	81	2 – 3	5 – 6	
3	2,0	0.09	1,1180	0,94	—	64	4 – 5	2 – 3	15-17
					+	92	1 – 2	6 – 7	

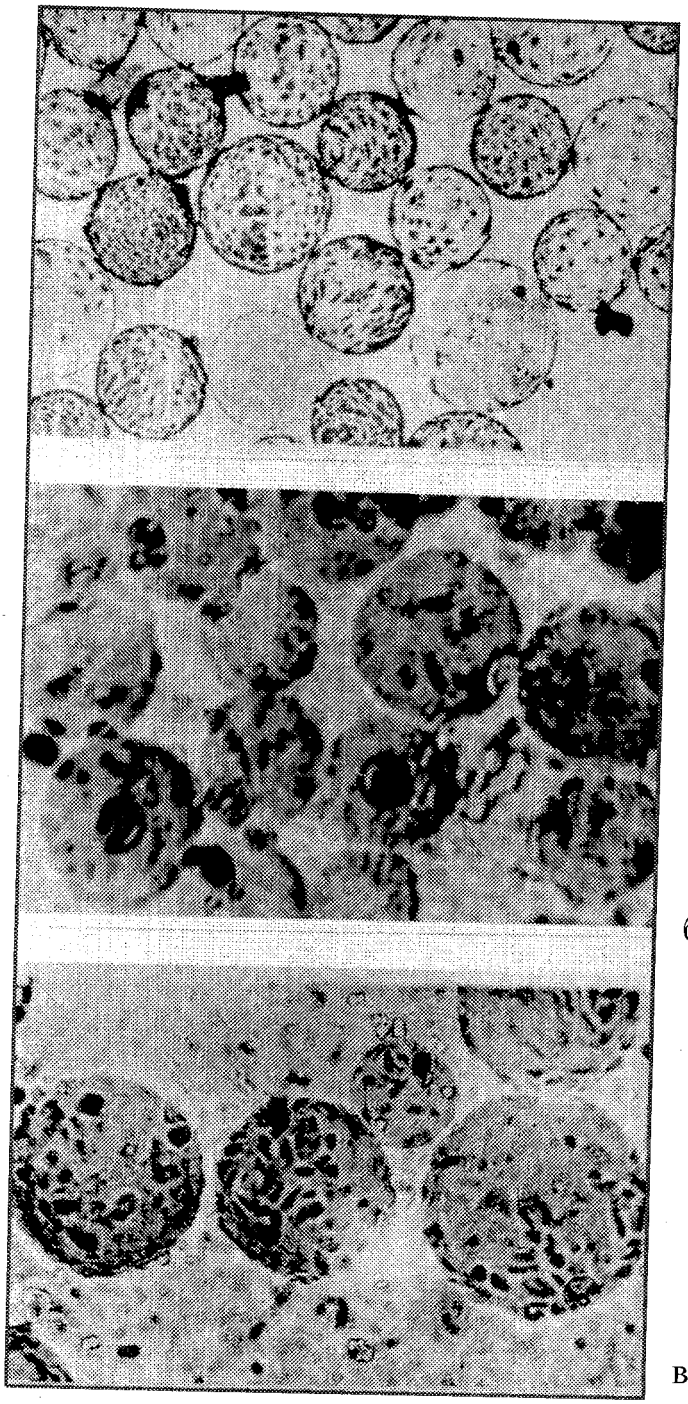
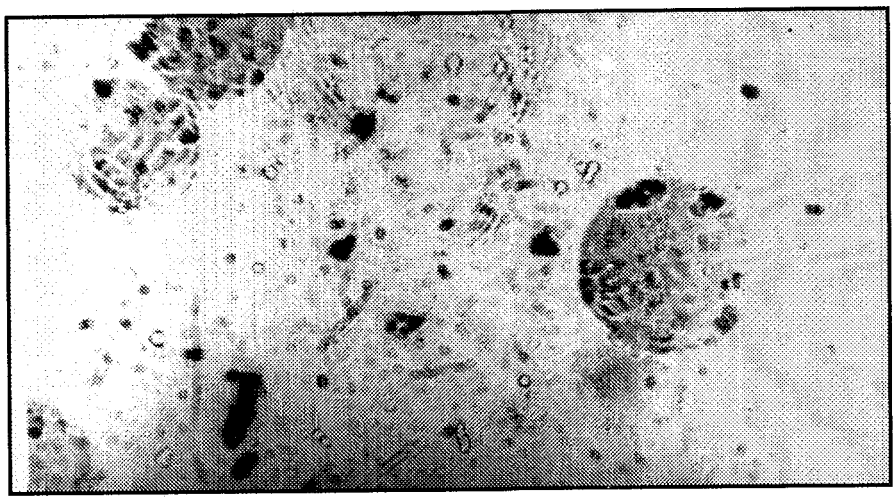
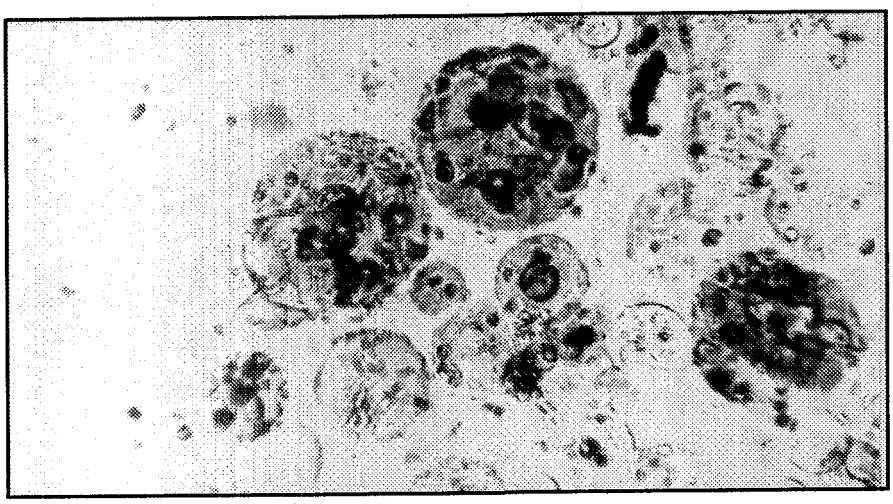


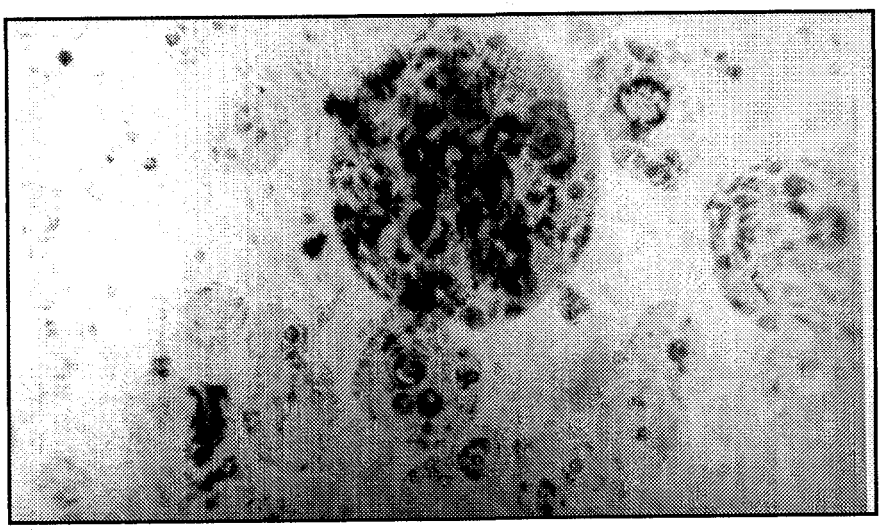
Рис.45. Динамика образования монослоя клеток на положительно заряженных гранулах микроносителя через 12 (а), 24 (б) и 72 (в) часа.



а



б



в

Рис. 46. Динамика образования монослоя клеток на отрицательно заряженных гранулах микроносителя через 12 (а), 24 (б) и 72 (в) часа.

время образования монослоя, кратность прироста клеток и время их переживания наблюдаются при использовании коллагеновых микроносителей, имеющих положительный заряд и диаметр частиц 20 мкм (рис.45-46).

6.5. Коллаген как сорбент для аффинной хроматографии

Совместно с сотрудниками Всесоюзного кардиологического центра АМН СССР нами разработан способ выделения фибронектина из плазмы крови человека путем аффинной хроматографии на сорбенте, представляющем собой гранулы поперечносшитого глутаровым альдегидом денатурованного коллагена, покрытые желатином (164).

Как известно, фибронектин представляет собой высокомолекулярный гликопротеид, содержащийся на клеточной поверхности, в базальных мембранах и биологических жидкостях (308). В молекуле фибронектина имеются фрагменты, способные специфически взаимодействовать как с нативным, так и с денатурированным коллагеном. На основе лигандной способности фибронектина связываться с коллагеном разработаны методы выделения и очистки его на иммобилизованном коллагене. Причем, следует отметить, что взаимодействие этих двух гликопротеидов имеет важное физиологическое значение и определяет ряд функций фибронектина (84).

Разработанный нами способ, по сравнению с известными, характеризуется более высоким выходом (до 37 %) и чистотой выделяемого фибронектина (99 %). Уровень исходного фибронектина в плазме подвержен колебаниям (180-600 мг/л), однако емкость сорбента такова, что позволяет за один шаг имммуносорбции провести исчерпывающее извлечение фибронектина (табл.54).

График элюции фибронектина с сорбента, представленный на рис.47, свидетельствует о чистоте и гомогенности выделяемого препарата.

Диск-электрофорез в полиакриламидном геле (рис.48) и иммуноэлектрофоретические исследования (рис.49) также подтверждают высокое качество целевого продукта. Тот факт, что даже с использованием таких точных методов анализа не удается обнаружить загрязнения препарата иными макромоле-

кулярными компонентами плазмы крови подтверждает перспективность разработанного способа выделения фибронектина.

Таблица 54

Характеристика сорбента по выходу целевого продукта

Партия сорбируемой плазмы	Исходное содержание фибронектина в плазме, мг/л	Количество выделенного фибронектина	
		мг	%
1	230	225	97,8
2	420	410	97,6
3	305	300	98,3
4	190	187	98,4
5	280	270	96,4

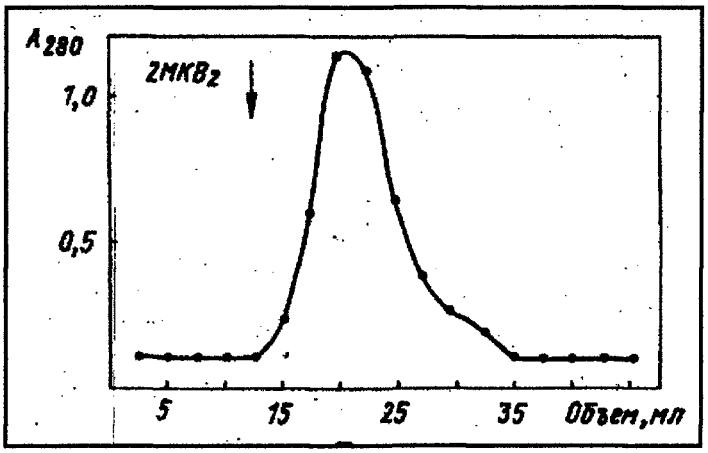


Рис.47. График элюции фибронектина с коллагенового сорбента

Рис.48. Гомогенность фибронектина при SDS-электрофорезе в полиакриламидном геле.

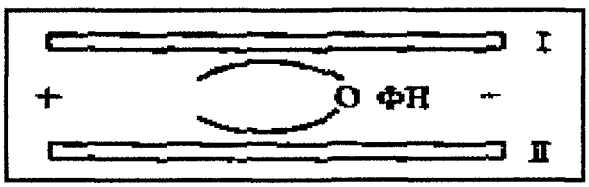


Рис.49. Серологическая гомогенность фибронектина при иммуноэлектрофорезе:1 - антисыворотка к сывороточным белкам человека; 2 - моноспецифическая антисыворотка к фибронектину

В виду того, что фибронектин является ценным лечебным препаратом и, будучи важным звеном в деятельности защитных систем организма, может быть использован при лечении обширных травм, сепсиса, ожогов, последствий обширных кровопотерь, острых кишечных инфекций, необходимо, чтобы после элюции сорбента он сохранял свою биологическую активность.

Результаты проверки биологической активности фибронектина по такому показателю как влияние на адгезию и распластывание клеток представлены в табл.55.

Таблица 55

Влияние фибронектина на адгезию и распластывание клеток на поверхности, покрытой коллагеном

Поверхность	Адгезия, %	Распластывание, %
Коллаген	18	12
Коллаген, обработаный фибронектином	88	47

Полученные данные говорят о том, что разработанный способ выделения фибронектина позволяет сохранить основные характеристики его биоактивности,о чем свидетельствует повышение адгезии клеток до 70 % и распластывания на 35 % по сравнению с контролем.

Коллагеновый сорбент был использован не только для получения фибронектина из плазмы крови людей, но и из плазмы крови сельскохозяйственных животных (117). На наш взгляд, наработка гетерологичного фибронектина для медицинских нужд (хотя бы для наружного применения) и гомологичного для каждого вида животных фибронектина для нужд ветеринарии весьма актуальна и может стать одной из доходных отраслей в деле утилизации и переработки плазмы крови убойных животных.

6.6 Применение коллагена для шлихтования пряжи

Уникальные свойства коллагена делают возможным его использование не только при производстве препаратов и биоматериалов ветеринарного, ме-

дицинского, фармацевтического, косметического и биотехнологического назначения, но и в текстильной промышленности в качестве раствора для шлихтования шерстяной пряжи (152).

Обработка нитей шлихтовальным раствором оказывает существенное влияние на параметры пряжи и, соответственно, на качество получаемой ткани. В результате шлихтования повышается гладкость и прочность нити за счет склеивания волокон друг с другом, на поверхности образуется защитная пленка, предохраняющая нить от истирания в процессе ткачества (69, 75).

К преимуществам шлихтовального раствора на основе коллагена, получаемого из отходов сырья животного происхождения, перед традиционно применяемыми в промышленности шлихтующими материалами (крахмалы, мука, животный клей, желатин, различные смолы) можно отнести то, что он легко доступен, не является пищевым продуктом, не требует применения расщепителей (химических реагентов, измельчающих молекулы), может быть достаточно легко наработан в требуемых количествах.

Важным показателем характеризующим шлихтовальный раствор, является приклей - увеличение массы пряжи в результате нанесения на нее шлихты. Величина приклея зависит от его состава, концентрации, вязкости, температуры, а также степени отжима пряжи.

В табл. 56 представлены результаты поисковых экспериментов, направленных на выбор раствора коллагена, обладающего физико-химическими параметрами, максимально соответствующими производственным требованиям, предъявляемым к шлихте, среди которых особое значение имеют такие показатели как однородность раствора, его вязкость, способность к проникновению вглубь нити, а также к пленкообразованию на ее поверхности, pH, клейкость и др.

С учетом того, что обычно в производственных условиях используют шлихтовальные растворы с относительной вязкостью 1,1-2,0 % и водородным показателем не ниже 5,0, наиболее приемлемыми для использования в качестве шлихтовального раствора следует , по всей вероятности, считать препараты

№4 и №5, содержащие соответственно 0,61 % и 0,5 % сухого остатка (коллагена) и имеющие pH 5,2.

Таблица 56

Некоторые физико-химические и клеящие свойства растворов коллагена различной концентрации

Варианты	Анализируемые показатели (средние значения, n=5)				
	сухой остаток, %	pH	плотность, кг/м^3	абсолютная вязкость, сПз	приклей, %
1	1,49	4,5	1,318	—	0,33
2	1,00	4,7	1,144	2485,56	0,62
3	0,74	4,8	1.128	423,32	0,71
4	0,61	5,2	1,111	1,66	1,15
5	0,50	5,2	1,100	1,42	0,80

В растворах № 1-3 вязкость значительно выше. Поэтому, несмотря на образование пленки на поверхности нитей, проникновение шлихты внутрь нитей затруднено вследствие наличия в ней довольно крупных ассоциатов коллагена, что подтверждается данными по величине истинного приклея, которые в первых трех случаях значительно ниже, чем в двух последующих. Самое большое увеличение массы зафиксировано у волокон, обработанных раствором коллагена с содержанием сухого остатка 0,61 %. При уменьшении концентрации раствора эффективность шлихтования по показателю приклея снижается, так как наряду с белком вглубь нити проникают, по всей вероятности, сравнительно большое количество воды.

Одним из важнейших свойств шлихтовального раствора является способность увеличивать разрывное удлинение обработанной им нити основы, т.е. увеличивать ее прочность. Для этого в выбранный для дальнейшей работы по результатам предыдущего опыта раствор коллагена (№ 4) вводили вещества различной химической природы, которые, проникая внутрь нити, могли бы в силу своих особенностей, упрочнять их структуру. Полученные смеси были проанализированы по показателям плотности и вязкости (табл.57).

Сравнительная оценка влияния приготовленных вариантов опытной коллагенсодержащей шлихты и традиционно применяемых на Краснохолмском

камвольном комбинате шлихты и эмульсии на шерстяную нить основы (187) показала, что из всех испытанных вариантов наилучшими свойствами по показателям видимого и истинного приклея, а также увеличения прочности обработанной пряжи достоверно обладают золи коллагена в смеси с полиэтиленгликолем и комплексонатом цинка (табл.57).

Таблица 57

Плотность и вязкость шлихтовальных растворов на основе коллагена с различными добавками (средние значения, n=3)

Состав шлихтовального раствора	Соотношение компонентов шлихтовального раствора	Анализируемые показатели		
		плотность, кг/м^3	вязкость	
			абсолютная, сПз	относительная, %*
Коллагеновый золь		1,111	1,6604	1,7
Коллагеновый золь+глицерин	250:1	1,149	1,8369	1,8
Коллагеновый золь+комплексонат цинка	100:1	1,141	1,7505	1,8
Коллагеновый золь+полиэтиленгликоль	20:1	1,154	1,6375	1,6

* относительная вязкость рассчитана относительно воды

Таблица 58

Сравнительная оценка основных технологических параметров пряжи, обработанной различными видами шлихты (n=10)

Состав шлихтовального раствора	Видимый приклей, %	Истинный приклей, %	Нагрузка при разрыве нити, г	
			до шлихтования	после шлихтования
Коллагеновый золь	73,58±7,77[2]	1,5±0,12[3,5]	1438±12,09	1524±17,25
Коллагеновый золь+глицерин	62,82±7,97[1]	1,22±0,18[4]	1460±14.0	1608±51,65
Коллагеновый золь+комплексонат цинка	90,38±4,84[3,5]	2,11±0,28[3,5]	1442,5±15,32	1610±43,91
Коллагеновый золь+полиэтиленгликоль	127,29±8,60[3,5]	1,84±0,06[3,4]	1427±51,26	1620,8±38,84
Шлихта стандартная	45,45±4,8	0,82±0,09	1440±11,93	1471±33,89
Эмульсия	58.75±6,5	0,81±0,07	1460±14,14	1533±32,66

Примечание: 1. P<0,05. 2. P<0,01. 3. P<0,001 - относительно шлихты; 4. P<0,01. 5. P<0,001 - относительно эмульсии.

Выраженное положительное влияние коллагенсодержащих шлихтовальных растворов на технологические параметры ряжи позволяет рекомендовать использование коллагенового золя в качестве основы для приготовления шлихты, тем более что его вязкость можно регулировать изменением концентрации белка и водородного показателя.

6.7. Использование солюбилизированных фибриллярных белков в качестве добавок в косметические средства

Уход за кожей лица, в том числе и стареющей, а также за волосами требует применения препаратов, обладающих увлажняющим действием, нормализующих структуру тканей и стимулирующих процессы обновления клеток.

Принимая во внимание основной принцип гомеопатии "подобное лечится подобным", косметологам следует проявить интерес к использованию в составе готовых косметических средств натуральных продуктов не только растительного, но и животного происхождения. К таким веществам относятся природные биополимеры коллаген, эластин и кератин, составляющие основу кожного покрова, волос и ногтей. Особенностью этих белков является их филогенетическое родство у разных видов животных и человека.

Разработанные и запатентованные нами способы солюбилизации белоксодержащих отходов сырья животного происхождения (Приложение), позволяют получать высокоочищенные молекулярно-диспергированные препараты фибриллярных белков с содержанием основного компонента до 98,0-99,0 % от массы сухого остатка. Полученные препараты безвредны, не обладают раздражающим действием, не вызывают аллергической реакции, хорошо резорбируются под действием тканевых ферментов, поставляя необходимый организму биологический материал, стимулируют обменные процессы в коже и в волосе.

На препараты коллагена, эластина и кератина косметического назначения утверждена нормативно-техническая документация (ТУ 61-19-201-93, ТУ 61-19-200-93, ТУ 64-19-202-93). Качество препаратов подтверждено гигиениче-

скими сертификатами, выданными Центром гигиенической сертификации парфюмерно-косметической продукции НИИ медицины труда РАМН при Государственным комитете санитарно-эпидемиологического надзора РФ.

Косметические средства, содержащие солюбилизированные коллаген, эластин и кератин, получили высокие положительные оценки по эффективности воздействия. Они хорошо проникают в кожу и в волос, блокируют свободные радикалы молекул, разрушенных в процессе старения и под действием агрессивных факторов внешней среды, ускоряют репаративные процессы в эпидермисе, обеспечивая коже надежную защиту, а также улучшают механические свойства поврежденных волос.

Так, например, использование растворимой формы фибриллярного кератина, как в чистом виде, так и в качестве добавки в эмульсионный крем для волос, улучшает механические свойства волос, особенно поврежденных.

При сравнительной оценке исходных физико-механических параметров здоровых и поврежденных волос было установлено, что показатели, характеризующие прочность нормальных волос, в среднем на 30% выше, чем у поврежденных. Выдержка здоровых волос в растворе кератина и креме, содержащем этот белок, практически не изменяет их прочностные характеристики. Что касается поврежденных волос, то обработка кератином и кремом, содержащим этот белок, приводит к достоверному увеличению жесткости кортекса, снижению относительного удлинения и уменьшению пористости (рис50-55). Причем, после обработки кератином и кремом прочностные и деформационные характеристики поврежденных волос становятся близки к значениям аналогичных показателей для здоровых волос, что объясняется более активным проникновением молекул микрофибриллярного кератина в структуру поврежденных волос и образованием новых поперечных связей между свободными активными функциональными группами протеинов волоса.

Следует отметить, что крем с кератином оказывает более выраженный эффект, вероятно, за счет дополнительного воздействия остальных ингредиентов, входящих в его состав, Положительное влияние крема подтверждено на 20

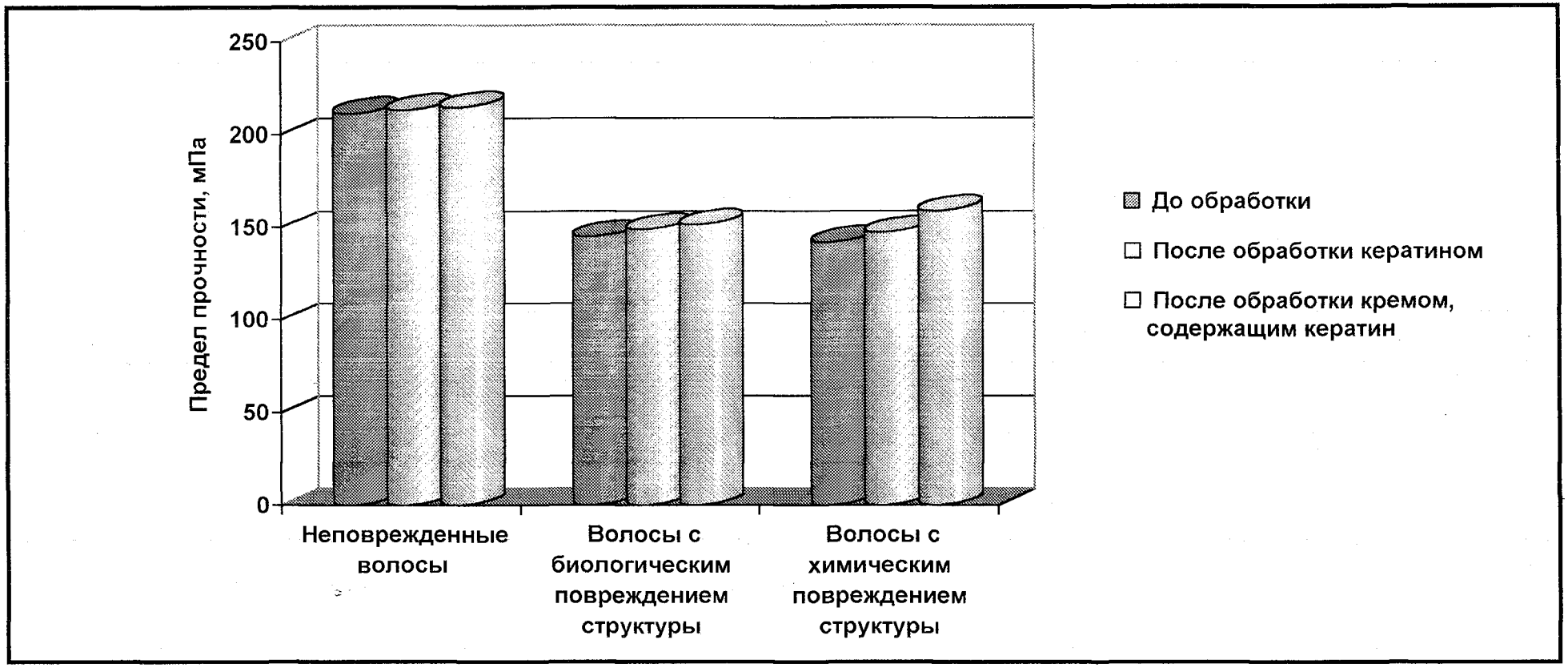


Рис. 50. Предел прочности при разрыве для неповрежденных и поврежденных волос

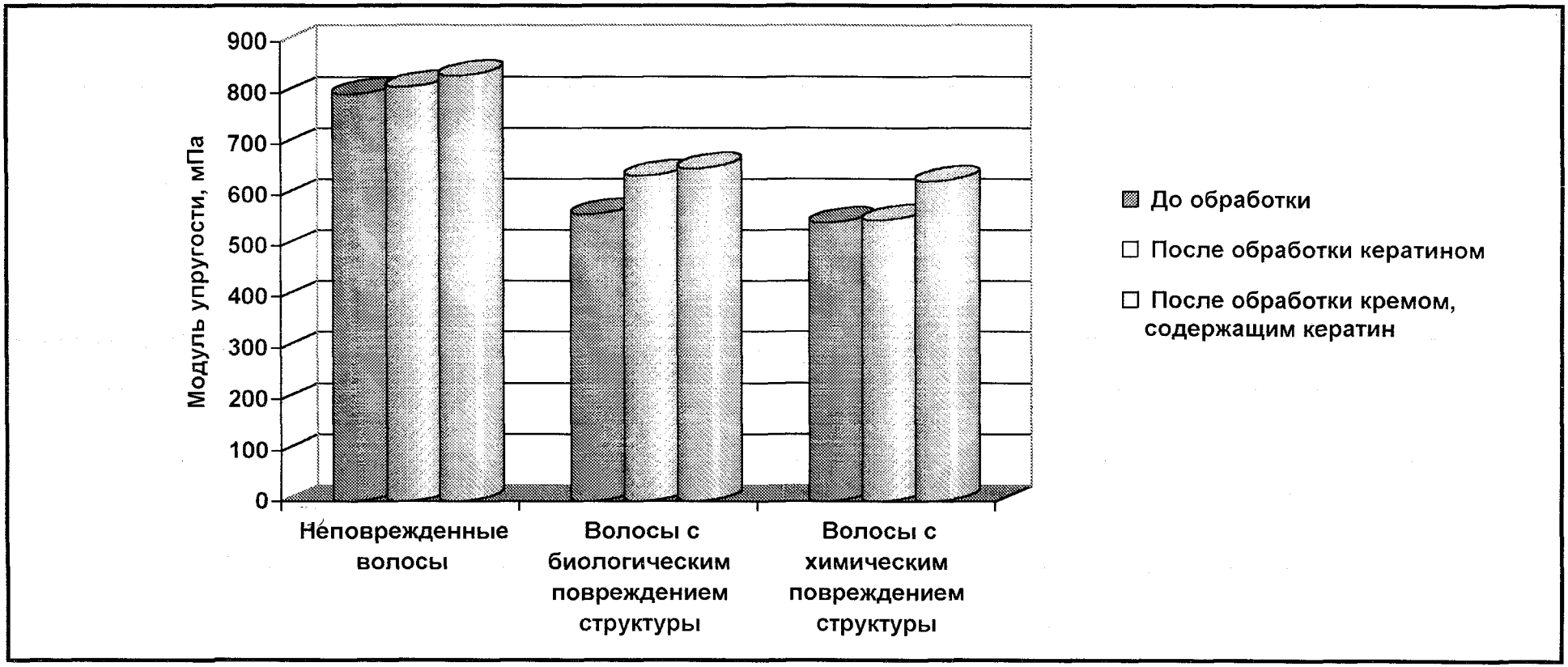


Рис.51. Модуль упругости при растяжении неповрежденных и поврежденных волос

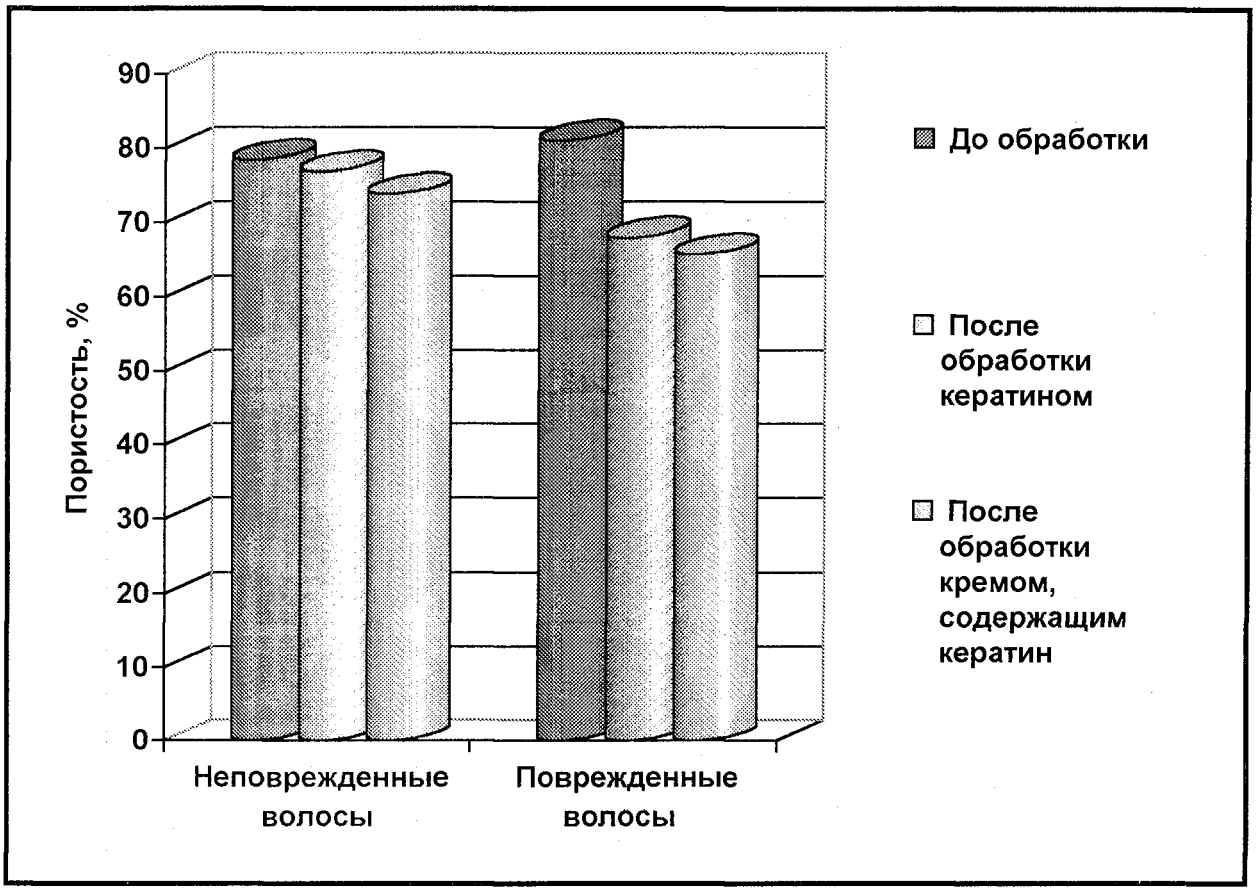


Рис.52. Сравнительная оценка пористости неповрежденных и поврежденных волос

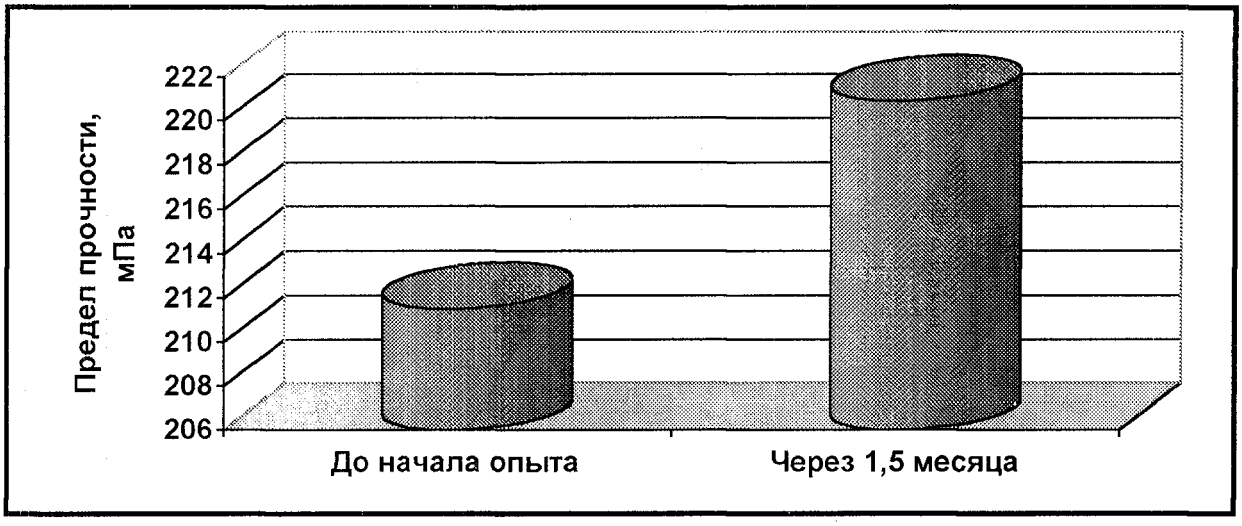


Рис.53. Сравнительная оценка предела прочности волос добровольцев до и после обработки кремом, содержащим кератин

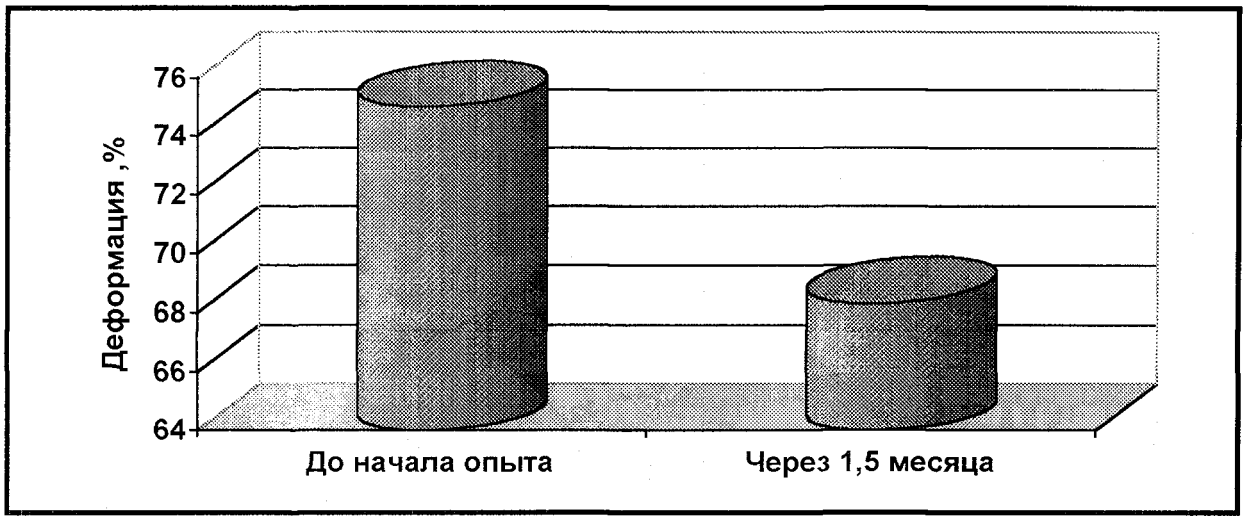


Рис.54. Сравнительная оценка относительного удлинения при разрыве волос добровольцев до и после обработки кремом, содержащим кератин

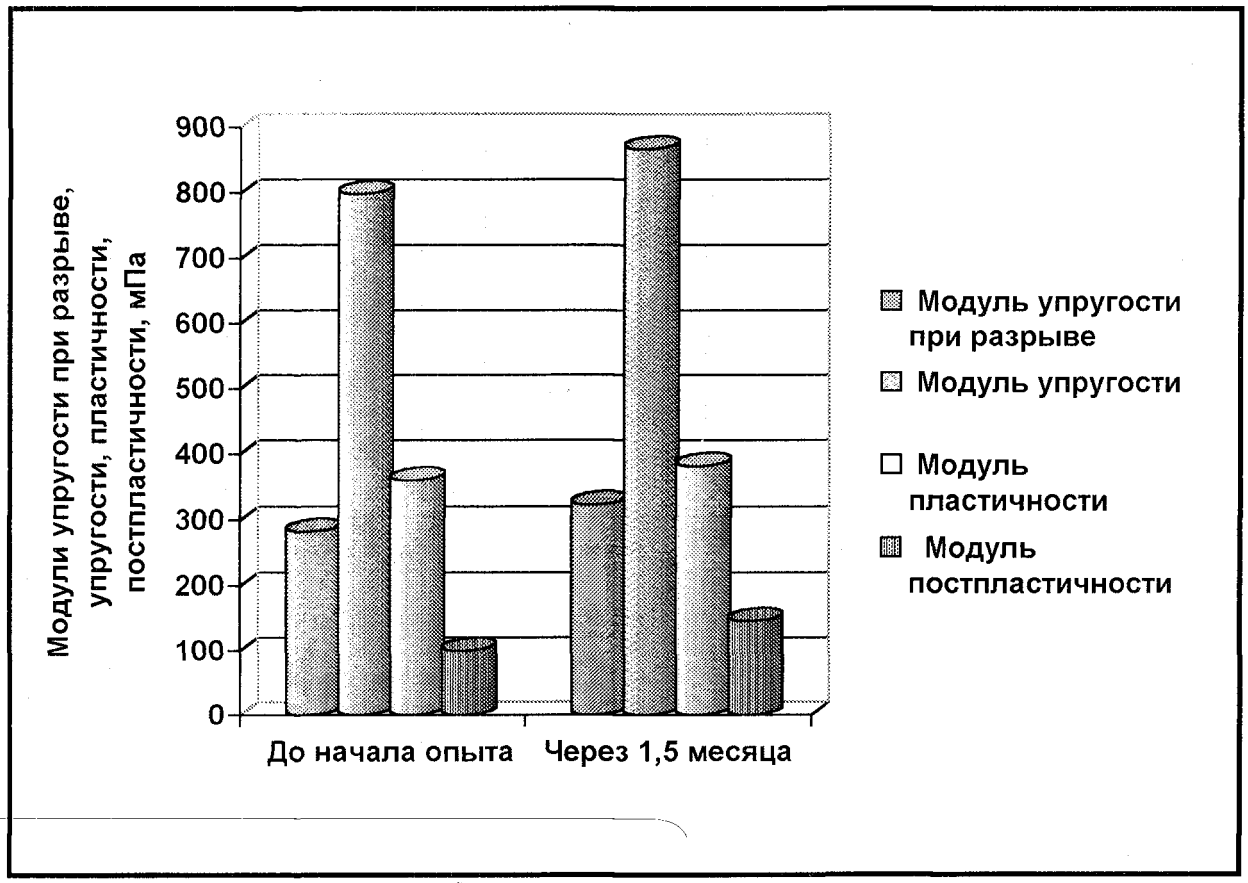


Рис.55. Сравнительная оценка показателей, характеризующих деформационные свойства волос добровольцев до и после обработки кремом, содержащим кератин

добровольцах, которые применяли его в течение 1,5-2 месяцев. Результаты визуального контроля свидетельствовали о появлении блеска, шелковистости волос, увеличении объемности прически, уменьшении, а в ряде случаев о приостановлении выпадения волос.

Использование солюбилизированных фибриллярных белков в качестве биологически активных добавок в косметические изделия позволяет повысить эффективность и расширить ассортимент отечественных косметических средств.

ВЫВОДЫ

Проведенные исследования позволили систематизировать и обобщить новые данные об особенностях строения и свойств фибриллярных белков, что дало возможность создать прогрессивные технологии их наработки из белоксодержащих отходов животного сырья, а также определило сферы практического применения этих биополимеров.

Благодаря установленным закономерностям, научно обоснованы теоретические предпосылки и предложены конкретные технические решения, сформулированные в следующих выводах.

1. Впервые проведена комплексная оценка структурных особенностей, химического состава и других свойств различных видов белоксодержащих отходов и побочных продуктов кожевенного, мясоперерабатывающего и шерстеперерабатывающего производств.
2. Установлено, что наиболее приемлемыми видами исходного сырья для наработки коллагена, эластина и кератина следует считать, соответственно, такие белоксодержащие отходы и побочные продукты как гольевой спилок шкур крупного рогатого скота и сухожилия, выйную связку крупного рогатого скота, очес шерсти овец.
3. Изучены энергетические показатели, характеризующие архитектонику коллаген-, эластин- и кератинсодержащих тканей в нативном состоянии. Определены количество и энергетический спектр межмолекулярных связей, скрепляющих структурные элементы тканей в единое целое, температуры начала гидротермического сокращения (Тнгс) и текучести (Тт) входящих в их состав фибриллярных белков, работа деформации гистоструктурных элементов биотканей, подвергающихся температурным воздействиям. Установлено, что различия, наблюдаемые при сравнении термодеформационных кривых (ТДК), относящихся к различным видам тканей, обусловлены соотношением кристаллических и аморфных областей в отдельных фибриллярных белках, а также степенью их структурирования за счет разного

числа поперечных межмолекулярных связей различной природы.

4. Разработаны способы целенаправленного получения высокоочищенных препаратов фибриллярных белков из различных видов отходов. Созданы технологии наработки этих белков в экспериментально-производственных условиях. Показана возможность получения как фибриллярного коллагена, так и солюбилизированных до состояния макромолекул высокоочищенных препаратов коллагена, эластина и кератина.
5. Предложен новый пероксидно-щелочного способ обработки белоксодержащих отходов, позволяющий интенсифицировать процесс очистки фибриллярных белков от сопутствующих биополимеров, облегчающий их последующее растворение. Применение нового способа позволяет исключить загрязнение сточных вод сульфатами, а также ускорить процесс наработки фибриллярных белков, не снижая степени чистоты и других показателей качества готового продукта.
6. Разработаны объективные методы контроля технологических процессов, а также оценки качества сырья и готовых препаратов фибриллярных белков по содержанию коллагена, неколлагеновых белков, углеводных компонентов (гексоз и гексозаминов), жировых веществ, по термодеформационным характеристикам, по агрегативной стабильности, антигенности, бактериальной обсемененности и ряду других показателей. Даны рекомендации по целесообразности использования отдельных показателей при оценке качества различных препаратов. Наиболее информативные показатели включены в нормативно-техническую документацию.
7. Впервые созданы, экспериментально изучены, апробированы, внедрены в ветеринарную и медицинскую практику препараты различных форм и назначений с заданными свойствами на основе коллагена. Показано, что иммобилизация известных лекарственных и биологически активных средств на коллагене позволяет значительно улучшить их свойства: пролонгирует действие, снижает токсичность, уменьшает местную раздражающую реакцию, повышает терапевтический и диагностический эффекты. Установле-

но, что коллаген улучшает свойства иммобилизуемых веществ за счет синергизма действия. Продемонстрирован широкий спектр возможностей применения коллагена в качестве основы для создания дюрантных препаратов в виде растворов для инъекций, мазей, пленок.

8. Показана возможность использования коллагена
   - в биотехнологии как микроносителя для псевдосуспензионного культивирования субстратзависимых клеток;
   - в лабораторно-диагностической практике как сорбента для аффинной хроматографии при выделении и очистке биологически активных веществ, а также в иммунологических исследованиях в качестве антигена;
   - в текстильной промышленности в качестве основы шлихтовального раствора для обработки шерстяной пряжи.
9. Показана перспективность и подтверждена целесообразность использования коллагена, эластина и кератина как биологически активных добавок в косметических средствах по уходу за кожей лица и волосами. Включение солюбилизированных фибриллярных белков в рецептуры косметических средств значительно улучшает их потребительские свойства, позволяет расширить ассортимент конкурентоспособных отечественных косметических средств.
10. Создание на основе фибриллярных белков широкого ассортимента препаратов нового поколения для ветеринарии, медицины, биотехнологии, косметологии и других отраслей народного хозяйства, убедительно свидетельствует в пользу дальнейшего развития нового, экономически выгодного, способствующего нормализации экологической обстановки, направления в области переработки и рационального использования белоксодержащих отходов сырья животного происхождения.

Список использованной литературы

1. Алексеев Н.С., Ганцов Ш.К., Кутянин Г.И. Теоретические основы товароведения непродовольственных товаров. /Учебник. //М.-Экономика.-1988.-295 с
2. Андрианова Г.П., Куциди Д.А., Шестакова И.С. Химия и физика высокомолекулярных соединений в производстве искусственной кожи и меха. //М.: Легпромиздат.- 1987.- 464 с.
3. Антипова Л.В., Глотова И.А. Перспективы нетрадиционных технологий в получении пленочных биополимеров и ингредиентов из вторичного коллагенсодержащего сырья. // Междунар. научн. конф. "Рациональные пути использования вторичных ресурсов АПК", Краснодар, 24-26 сент., 1997./ Тез. докл. – Краснодар- 1997. – с.25-27.
4. Антипова Л.В., Глотова И.А., Жданова О.А. Направленная модификация отходов шкуросырья с целью организации технологий съедобных оболочек. // Современные проблемы качества мясного сырья и его переработки./ Тез. докл. межгос. науч. семинара. 25-27 ноября 1993 г.-Кемерово.-1993.-с.55.
5. Антипова Л.В., Глотова И.А., Полянских С.В. Технологии экологически чистых пищевых добавок, оболочек и покрытий на основе вторичного коллагенсодержащего сырья мясной и птицеперерабатывающей промышленности. // Междунар. науч. конф. "Прогрессивные технологии и техника в пищевой промышленности" Краснодар, 19-21 сент., 1994 / Тез. докл. – Краснодар.-1994.-с.229.
6. Апраскина С.К., Корнишенко Н.В. К вопросу рационального использования коллагенсодержащего сырья мясной промышленности. // Современные проблемы качества мясного сырья и его переработки./ Тез. докл. межгос. науч. семинара Кемерово 25-27 ноября, 1993.-Кемерово.-1993.-с.37-38.
7. Артемов А.В., Сидорова Т.П., Зинченко Т.В. Использование отходов кожевенного производства для шлихтования шерстяной и хлопчатобумажной пряжи. // Текстильная промышленность. –1996. - №3. – С.20-23.
8. Афиногенов В.А., Васильев А.В., Мымрина И.А., Терских В.В. Взаимодействие эпидермальных кератиноцитов и фибробластов в процессе формиро-

вания живого эквивалента кожи. //Цитология.-1992.-№11-12.-с.60-65.

9. Бабак В.Г. Коллоидная химия в технологии микрокапсулирования. Ч.1. // Свердловск.-Изд-во Урал. Ун-та.-1991.-171с.
10. Баблоян О.О. Модификация коллагена, создание и освоение новых технологических процессов его переработки. Автореферат диссертации на соискание ученой степени д-ра технич. наук.- М.-1984.–50 с. (для служеб. польз.).
11. Банников Г.А., Гельштейн В.И., Глейберман В.С., Любимов А.В., Мойжес Т.Г., Самойлов В.И. Явления индукции и дифференцировки при опухолевом росте. // М.- Наука.- 1981.- 263 с.
12. Беленький М.Л. Элементы комплексной оценки фармакологического эффекта. // Л. –Медгиз.- 1963.-152 с.
13. Богомильский М.Р., Сапожников Я.М., Марчук А.И., Сапожникова А.И. О перспективах использования эргомиогенной сыворотки крови как прогностического теста в лечении нейросенсорной тугоухости. // III Российский национальный конгресс "Человек и лекарство" 16-20 апреля 1996 г./ Тезисы докладов. /М.-РЦ "Фармединфо".-1996.-с.79.
14. Боресков В.Г., Калюзин Г.П., Ушакова И.А. Перспективные технологии производства мясных изделий с использованием коллагенсодержащего сырья.// Мясная индустрия. – 1997. - №8. – С.9-10.
15. Валиотти Б.Н., Зайков Г.Е., Тимонин В.А., Чирков В.В. Кинетика процесса усадки одноосно ориентированной ПЭНД. // Пластические массы.- 1991.- №1.- с.35-36.
16. Веденеев В.И. и др. Энергия разрыва химических связей, потенциалы ионизации и сродство к электрону. / Справочник // М.- АН СССР.- 1962.- 215 с.
17. Вильямс В., Вильямс Х. Физическая химия для биологов. //М.- Мир.- 1976.- 600 с.
18. Войцеховская А.Л., Вольфензон И.И. Косметика сегодня.//М.-Химия,175 с.
19. Волкобой А.Н., Карпухина Л.И., Пономарев С.Г. и др. Внедрение технологии переработки отходов. //Кожевенно-обувная промышленность.- 1985.- №9.- с.9-11.

20. Вспомогательный материал для изготовления бумаги, использующий коллагеновое волокно и способ его получения: Заявка 2293495 Япония, МКИ[5], Д21Н 17/22, Д21Н 15/02. // Осава Тосия; Хокуэцу *** к.к. - №1 – 114223, Заявл. 9.5.89. Опубл. 4.12.90.

21. Ганцов Ш.К., Цветкова Л.Г. О природе и практической значимости термоэффектов кератина волоса, определяемых методом ДТА. //Кожевенно-обувная промышленность.- 1987.- № 2.-с.47-50.

22. Ганцов Ш.К., Цветкова Л.Г. О природе и практической значимости термоэффектов кератина волоса, определяемых методами дилатометрии. //Кожевенно-обувная промышленность.- 1987.- №1.-с.47-49.

23. Гацура В.В. Методы первичного фармакологического исследования биологически активных веществ. // М.- Медицина.-1974.-143 с.

24. Головтеева А.А., Куциди А.С., Санкин Л.Б. Лабораторный практикум по химии и технологии кожи и меха. // М.- Легкая и пищевая промышленность.- 1982.- 312 с.

25. Гордиенко И.М. Влияние стерилизации и условий хранения на химический состав препаратов свиного спилка. //Вопросы улучшения качества и рационального использования сырья животного происхождения и продуктов животноводства. / Межвед. сб. научн. Трудов. / МВА.-1990.-с.84-86.

26. Государственная фармакопея СССР. /11-е изд.- Вып. 1. Общие методы анализа.// М.- Медицина.-1987.-333 с.

27. Государственная фармакопея СССР. /11-е изд.- Вып. 2. Общие методы анализа. Лекарственное растительное сырье.// М.- Медицина.-1990.-397 с.

28. Дерягин Б.В. Устойчивость коллоидных систем (теоретический аспект). //Успехи химии. 1979.- вып. 4.-с.675.

29. Ермолин Г.А., Лысенко А.Я. Количественный ферментный иммуноанализ. / Иммунологические методы исследования в клинике и эксперименте.//М.- ЦОЛИУВ.-1978.- т. ССХIX.-с.36-52 .

30. Есипова Н.Г. Условия существования и факторы стабилизации структур коллагенового типа. Автореф. дисс. на соискание ученой степени канд.

физ.-мат. наук. -Пущино.- 1974. –26 с.

31. Есипова Н.Г., Лазарев Ю.А. Исследование структуры коллагена спектральным и дифракционным методами. // В сб: Конформационные изменения биополимеров в растворах.- М.: Наука.- 1973.- 191 с..

32. Есипова Н.Г., Туманян В.Г. Расчет структуры коллагена. В сб.: Конформационные изменения биополимеров в растворах. М., Наука, 1973, 191 с.

33. Житников А.Я. Взаимоотношения между биосинтезом гликогена, сульфатированных протеогликанов и коллагена в дифференцирующихся хондроцитах. //Физиология и патология соединительной ткани./ Тез. докладов V Всесоюзной конференции. Новосибирск.-1980.-т.1.-с.138-139.

34. Журавская Н.К., Алехина Л.Т., Отряшенкова Л.М. Исследование и контроль качества мяса и мясопродуктов. //М.- Агропромиздат.- 1985. - 296 с.

35. Замараева Т.В., Лебедев Д.А. Поперечные ковалентные связи. стабилизирующие коллагеновые структуры в норме и патологии. //Вопросы медицинской химии.- 1985.- №1.-с. 10-23.

36. Зеленев Ю.В., Макаров-Землянский Я.Я. Термомеханический метод оценки релаксационных спектров коллагена кожи. // Пластические массы.- 1998.- № 4, с. 37 – 40.

37. Иванова Л.А., Орлова Т.В. Получение глазных лекарственных пленок противовоспалительного действия на основе коллагена. // Науч. труды. / ВНИИ фармации.- 1990.-т.28.-с.136-140.

38. Иванова Л.А., Сыченников И.А., Кондратьева Т.С. Коллаген в технологии лекарственных форм //М.- Медицина.- 1984. -112 с.

39. Инструкция по экспериментально-клинической апробации косметических средств. //НИИ косметологии.-1986.- 26 с.

40. Использование кожевенных отходов с учетом их биологической ценности. //Информация об отечественных и зарубежных достижениях науки, техники и пр-ва в кожев. и мех. пром-сти. Выпуск 1. /Печатный аналог фрагментов в банке данных ЦНИИТЭИлегпром.- М..- 1993.- с.3-8.

41. Истранов Л.П. Исследования в области технологии коллагеновых препара-

тов и изделий медицинского назначения. Автореферат диссертации на соискание ученой степени д-ра фарм. наук. М., -1978. - 43 с. (для служеб. польз.).

42. Истранов Л.П., Истранова Е.В. Особенности использования коллагена в технологии лекарств. // Науч. труды ВНИИ фармации.-1990.- 28.- с. 132-136.

43. Карпухина Л.В., Пономарева А.В., Чайковский Р.И. Переработка отходов кожевенно-обувного производства. / Справочник. // М.- Техника.- 1983.-85 с.

44. Каспарьянц С.А. Закономерности влияния ассоциативных и комплексообразующих свойств коллагена на его состояние и эффективное использование. // Автореферат на соискание ученой степени доктора технич. наук. / М.-1989.-44 с.

45. Каспарьянц С.А. Научные основы рационального использования коллагенсодержащих материалов. //Структура, товарно-технологические свойства, методы обработки, улучшение качества и рациональное использование животного сырья и продуктов животноводства. / Межвед. сб. науч. трудов.- МВА.-1983.--с.6-11.

46. Каспарьянц С.А. О строении коллагенсодержащего сырья. // Доклады ВАСХНИЛ.-1980.-№2.-с.33-35.

47. Каспарьянц С.А. Основные компоненты соединительной ткани. //Вопросы улучшения качества и рационального использования сырья животного происхождения и продуктов животноводства. / Межвед. сб. научн. Трудов. / МВА.-1990.-с.8-12.

48. Каспарьянц С.А. Проблемы эффективной переработки и использования коллагенсодержащих материалов. //Товароведение и технология сырья и продуктов животного происхождения. / Межвед. сб. научн. трудов. / МВА.-1997.-с.4-6.

49. Каспарьянц С.А. Современные представления о структуре и свойствах коллагена. / Лекция. //М.-МВА.- 1981.-67 с.

50. Каспарьянц С.А. Технология кожи и основы товароведения готовой продукции. / Учебник. // М.- МВА- 1986- 176 с.

51. Каспарьянц С.А. Функции соединительной ткани. //Вопросы улучшения ка-

чества и рационального использования сырья животного происхождения и продуктов животноводства. / Межвед. сб. научн. Трудов. / МВА.-1990.-с.6-8.

52. Каспарьянц С.А. Химический состав шкуры и его значение в технологическом процессе получения кожи. / Лекция для студ. фак-та товароведения жив. сырья. Ч. 1. //М.-МВА.- 1981.-67 с.

53. Каспарьянц С.А., Житенко П.В., Сапожникова А.И. и др. Способ определения бактериальной обсемененности сырья животного происхождения. // Методические указания. - М.- МВА.-1987.-8 с.

54. Каспарьянц С.А., Ипполитова Т.В., Месропова Н.В., Сапожникова А.И., Финник В.П. "Лекарственный состав "Аминакол". //Рационализаторские предложения и изобретения, рекомендуемые Госагропромом СССР для внедрения в с/х производство. / Реферативный сборник. / М.- ВНИИТЭИ агропром.-1988.-№8.-с.31.

55. Каспарьянц С.А, Сапожникова А.И., Гордиенко И.М. Определение углеводных компонентов (гексоз и гексозаминов) в образцах кожевенного сырья, полуфабриката, готовой кожи и модифицированных коллагенсодержащих материалах. //Методические указания. - М.- МВА.-1984.-8 с.

56. Каспарьянц С.А, Сапожникова А.И., Гордиенко И.М.. Месропова Н.В. Получение растворов коллагена I типа. //Методические указания. - М.- МВА.-1984.-6 с.

57. Каспарьянц С.А., Месропова Н.В., Сапожникова А.И., Финник В.П. Средство профилактики стрессовых состояний у животных. // Биохимия сельскохозяйственных животных и Продовольственная програма. / Всесоюзный симпозиум. / Тезисы докладов. – Ташкент.-1986.-с.71-72.

58. Каспарьянц С.А., Сапожникова А.И., Месропова Н.В. Жидкостная субстанция коллагена и перспективы ее использования. // I Всесоюзная конференция "Жидкофазные материалы".-Иваново.-1990.-с.160.

59. Каспарьянц С.А., Сапожникова А.И., Месропова Н.В., Гордиенко И.М. Препараты и биоматериалы ветеринарного назначения на основе коллагеновых матриц. //Актуальные проблемы ветеринарной и зоотехнической науки в

интенсификации животноводства. /Материалы конф. / МВА.-1990.-с.174-175.

60. Каспарьянц С.А., Сапожникова А.И., .Месропова Н.В., Топорова И.В., Финник В.П. Комплексный витаминный препарат на коллагене. // Применение биотехнологии в животноводстве, растениеводстве и ветеринарной медицине. / Тезисы докладов Всесоюзной научно-технической конференции./ Центр. и ленинградское обл. правление НТО сельск. х-ва. - М.- 1988.-с.103.
61. Каспарьянц С.А., Хлудеев К.Д., Кирилюк Б.И., Сапожникова А.И. и др. Методические рекомендации по определению показателей качества кожевенного и шубно-мехового сырья. // М.-ВАСХНИЛ.-1986.-с.32.37.
62. Кендрью Дж. Структурные белки I. //В кн.: Белки. т.III, ч. II "Биохимия белковых веществ". Под ред. Г.Нейрата и К.Бейли. / М.- Ин. Лит-ра.-1959.-с.339-453.
63. Кисин М.В., Паршиков Ю.И., Вартанесян Э.В., Булышова Л.К., Матэ И. Исследование деструктивных изменений волос и искусственных волокон методом растровой электронной микроскопии.// М.: Медицина.- 1983.-48 с.
64. Комлев А.П., Чечеткин П.И., Попернацкий О.А. Производство белковой колбасной оболочки. //М.- Легкая и пищевая пром-ть.-1981.-144с.
65. Копейкина Л.В., Повойко Л.М. Использование коллагенсодержащего сырья как компонента рецептур мясных изделий. // 3-й Междунар. симп. "Экология человека: проблемы и состояние лечебно-профилактического питания".». 23-30 сентября 1994. / Тез. докл.- ч.1.-М.-1994.-с.131-132.
66. Кочетков Б.С. Новое в переработке отходов кожевенного производства. //Кожевенно-обувная промышленность. - 1992.- №4.- с.25-26.
67. Крылова Н.И., Лясковская Ю.Н. Физико-химические методы исследования продуктов животного происхождения. //М.-Пищепромиздат.-1967.-с.169-171.
68. Кульчицкий Ю.Л.,Петров В.Р. Утилизация крупнотоннажных кератинсодержащих отходов с получением новых ионообменных материалов. // Тез. докл. Всесоюз. совещения «Современные аспекты синтеза и производства

полнению физического практикума.// М.- МИНХ им. Г.В. Плеханова.-1986.- 18 с.

78. Лычников Д.С. Некоторые энергетические аспекты устойчивости водных солей металлов. / Методические указания к изучению спецкурса "Физические методы определения качества товаров". Ч. 1.// М.- МИНХ им. Г.В. Плеханова.-1986.-36 с.

79. Лычников Д.С. Некоторые энергетические аспекты устойчивости водных солей металлов. / Методические указания к изучению спецкурса "Физические методы определения качества товаров". Ч. 2.// М.- МИНХ им. Г.В. Плеханова.-1986.-36 с.

80. Лычников Д.С., Макаров-Землянский Я.Я., Гошокова Б.Б. Унифицированный термодеформационный метод оценки качества кож для верха обуви. // Вестник С.-Петербургского Гос. университета технологии и дизайна.–1997.- № 1.- с. 127-134.

81. Лычников Д.С., Мглинец А.И., Герасименко Н.И., Макаров-Землянский Я.Я и др. Исследование энергетических особенностей структуры коллагена методом термодеформации. //Хранение и переработка сельхозсырья.-1995.- №5.- с.22-24.

82. Лычников Д.С., Михайлов А.Н. Метод определения параметров активации коллагена кожевенного сырья, полуфабриката и кожи. // Изв. вузов. Технология легкой промышленности.- 1983.- № 3.- с. 73-77.

83. Лычников Д.С., Сапожникова А.И., Герасименко Н.И., Веретин В.С., Шишкина И.Г., Белевцова Д.В. Физические методы исследования свойств кожевенных и пушно-меховых материалов.// Межрегиональная научно-практическая конференция "Развитие меховой промышленности в России". /Сборник тезисов докладов. / М.-ОАО "НИИМП".- Издат. дом "Меха Мира".-1999.- с.45-48.

84. Любимов А.В. Поверхностные белки и их изменения при нормальном развитии и опухолевом росте. //В кн.: «Явления индукции и дифференцировки при опухолевом росте»./ М..- Наука.- 1981.- с.171-229.

85. Мазуров В.И. Биохимия коллагеновых белков. //М.- Медицина.- 1974.-120 с.

86. Макаров К.А., Кибардин С.А. Иммобилизованные биопрепараты в медицине. // М.-Медицина.-1980.- 128 с.

87. Мендельсон Д.А. Химия облагораживания, отбеливания и крашения меха.// М.- Легкая индустрия.- 1965.- 314 с.

88. Месропова Н.В., Сапожникова А.И. Взаимодействие коллагена с биологически активными веществами. //Строение, свойства, методы обработки, улучшение качества и рациональное использование сырья животного происхождения и продуктов животноводства. / Сб. науч. трудов.-МВА.-1981.-т. 118.-с.50-52.

89. Месропова Н.В., Сапожникова А.И. Применение коллагена в качестве матрицы для иммобилизации препаратов фенотиазинового ряда. //Структура, товарно-технологические свойства и рациональное использование животного сырья и продуктов животноводства. / Сб. науч. трудов.-МВА.-1982.-т. 125.-с.70-72.

90. Месропова Н.В., Гордиенко И.М., Сапожникова А.И. Методы контроля бактериальной обсемененности и структурных изменений природного биополимера коллагена. //Пути повышения использования вторичных полимерных ресурсов. // II Всесоюзн. конф. 27-30 июля 1989 г. / Тезисы докл. / Кишинев.-1989.-т.2.-с. 268.

91. Месропова Н.В., Михайлов В.С., Сапожникова А.И. Влияние аскорбиновой кислоты на комплексообразование коллагена с некоторыми нейролептическими препаратами. //Структура, товарно-технологические свойства, методы обработки, улучшение качества и рациональное использование животного сырья и продуктов животноводства. / Межвед. сб. науч. трудов.-МВА.-1983.-с.82-74.

92. Месропова Н.В., Сапожникова А.И., Гордиенко И.М. Применение коллагена для создания систем полимер-лекарственое вещество. //Пути повышения использования вторичных полимерных ресурсов. // II Всесоюзн. конф. 27-30 июля 1989 г. Тезисы докл. / Кишинев.-1989.-т.2.-с.259-260.

93. Месропова Н.В., Смирнова А.П., Финник В.П., Сапожникова А.И. Комплексный витаминный препарат на коллагене. //Строение, свойства, и рациональное использование сырья животного происхождения и продуктов животноводства. / Межвед. сб. науч. трудов.-МВА.-1984.-с.94-96.

94. Методические указания к постановке токсикологических исследований ингредиентов косметических средств в экспериментах на животных. /М.- Госкомсанэпиднадзор РФ.-1991.- с. 48.

95. Методическими указаниями по обоснованию предельно допустимых концентраций промышленных химических аллергенов в воздушной среде. /М.- Госкомсанэпиднадзор РФ.- 1996.-с.54.

96. Микрочастицы, способ их получения и применения в биологии. Пат. 4373027 США. МКИ^4 С 12N 5/00, 5/02. Публ. 08.02.83. Бюл. № 2

97. Минкин Е.В., Шестакова И.С. Влияние предварительной обработки коллагена на его растворение. – Науч. труды МТИЛП, - 1963. - №27. – с. 2-8.

98. Михайлов А.Н. Химия и физика коллагена кожного покрова. // М.- Легкая индустрия.- 1980.- 232 с.

99. Мозгов И.Е. Проблемы фармакологии в современном животноводстве. //М.- Колос.-1977.- 138 с.

100. Мозгов И.Е. Фармакология. /Учебник для вет. вузов и факультетов. // М.- Колос.-1979.-416 с.

101. Никитин В.Н., Перский Е.Э., Утевская Л.А. Возрастная и эволюционная биохимия коллагеновых структур.//Киев.- Наукова думка.- 1977. - 279 с.

102. Николаева М.А. Товароведение потребительских товаров. Теоретические основы. / Учебник для вузов. //М.- Изд-во "Норма".-1997.-283с.

103. Об унификации методов контроля медицинских и иммунобиологических препаратов. /Сборник инструкций.// М.- МЗ СССР.- 1983.- 85с.

104. Орехович В.Н, Шпикитер В.О. Биологическое значение, свойства, строение растворимых коллагеноподобных белков (проколлагенов).// М.- Изд. АН СССР.- 1962. - 31с.

105. Орехович В.Н. Проколлагены, их химический состав и биологическая

роль. //М.- Изд. АН СССР.- 1952. - 23 с.

106. Павлов С.А., Шестакова И.С., Касьянова А.А.. Химия и физика высокомолекулярных соединений в производстве искусственной кожи и меха. //М.- Легкая индустрия.- 1976.- 527 с.

107. Павлова А.З. Судебно-медицинское исследование волос (физико-химичес-кие методы). // Учебное пособие. -М.: ЦОЛИУВ.- 1986.-38 с.

108. Павлова В.Н., Копьева Т.Н., Слуцкий Л.И., Павлов Г.Г. Хрящ. // М.- Медицина. –1988. -320 с.

109. Плахотин М.В., Иткин Б.З., Лукьяновский В.А., Сапожникова А.И., Каспарьянц С.А, и др. Использование коллагенового материала в ветеринарной практике. //Ветеринария.-1985.-№11.-с.66.

110. Подложка для роста клеток и ее применение. Пат. 3440557 PS. МКИ С 12N 5/02. Публ. 02.01.86. Бюл. № 1.

111. Проблема белка. Т.1. Химическое строение белка. /Е.М. Попов, П.Д. Решетов, В.М. Липкина и др. – М.: Наука. –1995. –496 с.

112. Проблема белка. Т.2. Пространственное строение белка. /Е.М. Попов, В.В. Демин, Е.Д. Шибанова. – М.: Наука. –1996. –480 с.

113. Проблема белка. Т.3. Структурная организация белка /Е.М. Попов, В.В. – М.: Наука. –1997. –604с.

114. Пурим Я.А. Технология выделки пушно-мехового и овчинно-шубного сырья. // М.: Легкая промышленность.-1978.- 222с.

115. Райх Г. Коллаген.//М.- Легкая индустрия.- 1969.- 328 с.

116. Сапожникова А.И. Анализ антигенных и иммуногенных свойств искусственных коллагеновых материалов, применяемых в медицине и ветеринарной практике. // Структура, свойства и использование животного сырья и продуктов животноводства. / Сб. науч. трудов.-МВА.-1980.-т. 111.- с.60-63.

117. Сапожникова А.И. Биотехнологические возможности использования коллагена. // IV Российский национальный конгресс "Человек и лекарство" 16-20 апреля 1997 г./ Тезисы докладов. /М.-РЦ "Фармединфо".-1997.-с.289-290.

118. Сапожникова А.И. Выделение и характеристика фибриллярных белков из

отходов сырья животного происхождения. // Вопросы улучшения качества и рационального использования сырья животного происхождения и продуктов животноводства. / Межвед. сб. научн. трудов МВА.- 1990.- с.100-106.

119. Сапожникова А.И. Диск-электрофорез продуктов растворения коллагена из ахилловых сухожилий крупного рогатого скота. //Товароведение животного сырья. / Сб. науч. трудов.-МВА.-1977.-т. 91.-с.68-72.

120. Сапожникова А.И. Иммунохимический анализ продуктов растворения коллагена из ахилловых сухожилий крупного рогатого скота. //Товароведение животного сырья. / Сб. науч. трудов.-МВА.-1978.-т. 101.-с.53-54.

121. Сапожникова А.И. О возможности использования бычьего коллагена при диагностике некоторых патологических состояний соединительной ткани у человека. //Материалы молодых ученых по физико-химической биологии.-Баку.- Изд-во " ЭЛМ".- 1981.-с.89.

122. Сапожникова А.И. Изменение химического состава шкур крупного рогатого скота при ферментативном обезволашивании-золении. //Товароведение и технология сырья и продуктов животного происхождения. / Межвед. сб. научн. трудов. / МВА.-1997.-с.43-48.

123. Сапожникова А.И. Коллоидно-химические аспекты устойчивости гидрозолей коллагена, эластина и кератина. // Современные вопросы интенсификации кормления, содержания животных и улучшения качества продуктов животноводства. /Материалы конференции.-М.-МГАВМиБ.-1999.-с.93-94.

124. Сапожникова А.И. Перспективы использования фибриллярного кератина для лечения некоторых болезней волос человека. // V Российский национальный конгресс "Человек и лекарство" 21-25 апреля 1998 г./ Тезисы докладов. /М.-РЦ "Фармединфо".-1998.-с.615.

125. Сапожникова А.И. Получение и экспериментальное изучение комплексов коллагена с цитостатиками различной химической природы. // III Российский национальный конгресс "Человек и лекарство" 16-20 апреля 1996 г./ Тезисы докладов. /М.-РЦ "Фармединфо".-1996.-с.284.

126. Сапожникова А.И. Получение и исследование комплекса коллаген-гиалуроновая кислота. // II Российский национальный конгресс "Человек и лекарство" 10-15 апреля 1995 г./ Тезисы докладов. /М.-РЦ "Фармединфо".-1995.-с.244.

127. Сапожникова А.И. Профилактический антиникотиновый препарат на основе коллагена. // III Российский национальный конгресс "Человек и лекарство" 16-20 апреля 1996 г./ Тезисы докладов. /М.-РЦ "Фармединфо".-1996.-с.284.

128. Сапожникова А.И. Сравнительный иммунохимический анализ коллагенов I типа некоторых видов млекопитающих. //Физиология и патология соединительной ткани./ Тез. докладов V Всесоюзной конференции. Новосибирск.-1980.-т.1.-с.192-193.

129. Сапожникова А.И. Фибронектин из плазмы крови животных: получение и оценка возможностей использования. // VI Российский национальный конгресс "Человек и лекарство" 19-23 апреля 1999 г./ Тезисы докладов. /М.-РЦ "Фармединфо".-1999.-с.466-467.

130. Сапожникова А.И., Белевцова Д.В., Гошокова Б.Б., Лычников Д.С. Энергетические параметры переработки белоксодержащих отходов в растворенное состояние. // Двенадцатые международные плехановские чтения. / Тезисы докладов профессорско-преподавательского состава (20-22 апреля 1999 г.). / М.-РЭА им. Г.В.Плеханова.-1999.- ч.2.-с102-103.

131. Сапожникова А.И., Брейтман Л.Н., Мурадханов В.А., Корчевая Т.А., Чижова Т.И. Влияние солюбилизированного кератина на физико-механические параметры волос. // II Международная научно-практическая конференция "Биологически активные вещества и новые продукты в косметике" 26-28 ноября 1996. /Тезисы докладов./ М.-РПКА.-с.38-39.

132. Сапожникова А.И., Герасименко Н.И., Ковров Г.В., Белевцова Д.В., Лычников Д.С. Энергетические параметры архитектоники коллаген-, эластин- и кератинсодержащих тканей. // Хранение и переработка сельхозсырья.-1999.-№8.-с.59-64.

133. Сапожникова А.И., Гордиенко И.М. Влияние различных химических обработок на биохимический состав свиной спилковой обрези. //Строение, свойства, и рациональное использование сырья животного происхождения и продуктов животноводства. / Межвед. сб. науч. трудов.-МВА.-1984.-с.96-99.

134. Сапожникова А.И., Гордиенко И.М., Копенкин Е.П., Астоян И.А. Получение и характеристика коллагеновых пленок направленого действия из отходов сырья животного происхождения. // Теория и практика товароведения и рациональное использование сырья и продуктов животноводства. /Межвед. сборник науч. трудов.-М.-МВА.-1986.-с.105-108.

135. Сапожникова А.И., Гордиенко И.М., Платонова О.А. Химические методы контроля технологии получения коллагенового биоматериала из свиной спилковой обрези.//Структура, товарно-технологические свойства, методы обработки, улучшение качества и рациональное использование сырья и продуктов животноводства./Межвед. сб. науч. трудов.-МВА.-1985.-с.108-112.

136. Сапожникова А.И., Гордиенко И.М., Устинов А.П. Получение и оценка качества коллагеновой мази направленного действия из отходов сырья животного происхождения. //Актуальные проблемы производства кровезаменителей, консервантов крови, гормональных и органотерапев-тических препаратов. /Тезисы докладов III Всесоюзной научно-технической конференции.-М.- ВНИИТКГП.-1987.-с.221.

137. Сапожникова А.И., Гордиенко И.М., Хачиянц В.И., Овсянкина О.В. Выделение и характеристика фибриллярных белков из отходов сырья животного происхождения. //Вопросы улучшения качества и рационального использования сырья животного происхождения и продуктов животноводства. / Межвед. сб. научн. Трудов. / МВА.-1990.-с.100 –106.

138. Сапожникова А.И., Каспарьянц С.А. Применение фибриллярных белков в качестве матриц для получения дюрантных препаратов. // II Российский национальный конгресс "Человек и лекарство" 10-15 апреля 1995 г./ Тезисы докладов. /М.-РЦ "Фармединфо".-1995.-с.244.

139. Сапожникова А.И.. Каспарьянц С.А. Сравнительная оценка иммуноген-

ных свойств коллагена и продуктов его переработки. //Экспериментально-клинические аспекты применения биологических полимеров в медицине. / Сб. науч. трудов I МОЛМИ.-1981.-с.55-56.

140. Сапожникова А.И., Каспарьянц С.А., Дьяконова Е.Б., Топорова И.В., Смоленский В.И., Смирнова Л.П., Демкина М.М. Гранулированный микроноситель из коллагенсодержащих отходов сырья животного происхождения для культивирования клеток. // Применение биотехнологии в животноводстве, растениеводстве и ветеринарной медицине. / Тезисы докладов Всесоюзной научно-технической конференции./ Центр. и ленинградское обл. правление НТО сельск. х-ва. - М.- 1988.-с.137.

141. Сапожникова А.И., Каспарьянц С.А., Лукьяновский В.А. Применение коллагена крупного рогатого скота для иммунодиагностики системных заболеваний животных и человека. . // Современные вопросы интенсификации кормления, содержания животных и улучшения качества продуктов животноводства. /Материалы конференции.-М.-МГАВМиБ.-1999.-с.101-102.

142. Сапожникова А.И., Каспарьянц С.А., Месропова Н.В., Гордиенко И.М. Использование солюбилизированных фибриллярных белков в качестве биологически активных добавок в готовые косметические изделия. Тезисы докл. I-ой Международной научно - практической конференции "Биологически активные вещества и новые продукты в косметике". Москва, 26-28 ноября 1996.// М.- РПКА.-1996.-с.30-31.

143. Сапожникова А.И., Каспарьянц С.А., Месропова Н.В., Дьяконова Е.Б., Топорова И.В. Коллаген как микроноситель для применения в биотехнологии. //Пути повышения использования вторичных полимерных ресурсов. // II Всесоюзн. конф. 27-30 июля 1989 г. / Тезисы докл. / Кишинев.-1989.-т.2.-с. 266.

144. Сапожникова А.И., Каспарьянц С.А., Холмогорова Г.Т., Крикунов В.П., Ермолин Г.А. Определение содержания аутоантител к коллагену I типа (АТК) у больных ревматоидным артритом (РА). // X Европейский конгресс ревматологов. /Тезисы докладов.-1983.-с.76.

145. Сапожникова А.И., Каспарьянц С.А., Яровой А.И., Гордиенко И.М. Электрофоретическая характеристика продуктов растворения коллагена из ахилловых сухожилий крупного рогатого скота. //Доклады ВАСХНИЛ.-1978.-№6.-с.31-32.

146. Сапожникова А.И., Козлачкова Т.И., Лонский И.И. Применение ЭВМ для оптимизации комплексного химического анализа сырья животного происхождения. // Вопросы улучшения качества и рационального использования сырья животного происхождения и продуктов животноводства. /Межвед. сб. науч. трудов. / М.-МВА.-1988.-с.94-97.

147. Сапожникова А.И., Лукьяновский В.А., Каспарьянц С.А. Характеристика иммуногенных свойств ксенотрансплантатов из дермы крупного рогатого скота, модифицированной в результате различных обработок. //Структура, товарно-технологические свойства и рациональное использование животного сырья и продуктов животноводства. / Сб. науч. трудов.-МВА.-1982.-т. 125.-с.72-75.

148. Сапожникова А.И., Лукьяновский В.А., Костенко Т.С., Каспарьянц С.А., Гордиенко И.М. Лабораторно-экспериментальные критерии оценки качества биоматериала на основе коллагена. // Доклады ВАСХНИЛ.-1988.-№3.-с.34-36.

149. Сапожникова А.И., Лычников Д.С. Оценка агрегативной стабильности белковых субстанций косметического назначения. // II Международная научно-практическая конференция "Биологически активные вещества и новые продукты в косметике" 26-28 ноября 1996. /Тезисы докладов./ М.-РПКА.-с.11-12.

150. Сапожникова А.И., Месропова Н.В. Разработка универсальной технологии получения коллагена из различных видов недубленных отходов кожевенного производства. //Вопросы улучшения качества и рационального использования сырья животного происхождения и продуктов животноводства. / Межвед. сб. научн. Трудов. / МВА.-1992.-с.94 –103.

151. Сапожникова А.И., Месропова Н.В. Физико-химическая и биологическая

характеристика коллагеновой субстанции из отходов сырья животного происхождения. //Товароведение и технология сырья и продуктов животного происхождения. / Межвед. сб. научн. трудов. / МВА.-1997.-с.48-55.

152. Сапожникова А.И., Месропова Н.В., Топорова И.В. Коллаген – основа шлихтовального раствора. //Вопросы улучшения качества и рационального использования сырья животного происхождения и продуктов животноводства. / Межвед. сб. научн. Трудов. / МВА.-1990.-с.96 –98.

153. Сапожникова А.И., Сапожников Я.М. Использование коллагеновой мази при носовых кровотечениях. // V Российский национальный конгресс "Человек и лекарство" 21-25 апреля 1998 г./ Тезисы докладов. /М.-РЦ "Фармединфо".-1998.-с.615.

154. Сапожникова А.И., Сапожников Я.М. Использование коллагеновой пасты и пленки с лидокаином для аппликационной анестезии в оториноларингологии. // VI Российский национальный конгресс "Человек и лекарство" 19-23 апреля 1999 г./ Тезисы докладов. /М.-РЦ "Фармединфо".-1999.-с.467.

155. Сапожникова А.И., Эткин А.Ф. Диагностическая тест-система для выявления антител к коллагену. // Иммунодиагностика тропических паразитарных болезней. (Иммуноферментные методы диагностики заразных болезней).- М.- Центр. ин-т усовершенствования врачей МЗ СССР.-1980.-с.71-75.

156. Серов В.В., Шехтер А.В. Соединительная ткань.//М.- Медицина.-1981.- 312 с.

157. Сидоров И.В., Рогожкин А.Г. Лекарства для животных. // М.-Колос.-1979- 200 с.

158. Слуцкий Л.И. Биохимия нормальной и патологически измененной соединительной ткани.// Л.- Медицина.- 1969.-375с.

159. Слуцкий Л.И. Роль соединительной ткани в репаративных процессах. // В кн. Современные проблемы регенерации. / Йошкар-Ола.- Марийский гос. ун-т.- 1980.- с. 87-89.

160. Слуцкий Л.И. Современные представления о коллагеновых компонентах хрящевой ткани. //Вопр. мед. химии. - 1985. - №3. - с. 10-17.

161. Слуцкий Л.И., Симхович Б.З. Молекулярная гетерогенность коллагена. // Успехи современной биологии. –1980.- 89.- с.58-73.

162. Смоленский В.И., Смирнова Л.П., Демкина М.М., Каспарьянц С.А., Сапожникова А.И. Оценка качества микроносителей из отходов сырья животного происхождения. // Применение биотехнологии в животноводстве, растениеводстве и ветеринарной медицине. / Тезисы докладов Всесоюзной научно-технической конференции./ Центр. и ленинградское обл. правление НТО сельск. х-ва. - М.- 1988.-с.95.

163. Смоленский В.И., Смирнова Л.П., Демкина М.М., Сапожникова А.И., Каспарьянц С.А., Дьяконова Е.Б. Отработка технологии культивирования перевиваемых линий клеток на отечественных и импортных микроносителях. //Всесоюзная научно-практическая конф. "Интенсификация с/х производства в условиях радикальной экономической реформы". /Тезисы докладов./ Сумы.-1989.-с.168-169.

164. Способ выделения фибронектина. А.С. 1124230 СССР. МКИ^3 А 61К 37/02, С 07G 7/00. // Ермолин Г.А., Котелянский В.Э., Сапожникова А.И. и др. - № 3567898/28-13. Заявл. 29.12.82. Опубл. 15.11.84. Бюл.№ 42.

165. Способ культивирования вирусов. А.С 1559702 СССР. МКИ^4 С 12 N 5/00. //Сюрин В.Н., Смоленский В.И., Смирнова Л.П., Сапожникова А.И. и др. - № 4480652/13. Заявл. 7.09.88. Зарегистр. 22.12.89. Для служебн. польз.

166. Способ очистки суспензии спорозоитов эймерий от примесей. Пат. 2059711 Россия. МКИ^6 С 12N 1/02, А 61К 39/002. // Белостоцкая Г.Б., Хованских А.Е., Сапожникова А.И. - № 5050043/13. Заявл.31.07.92. Опубл. 10.05.96. Бюл.№13.

167. Способ получения водорастворимого кератинового белка. Заявка 251533 Япония МКИ^5 С 08Н 1/00, А 61К 7/00. // Саэки Купиоли, Йокагава Сидзи, Уэхара Кокити.- №63-202582.Заявл. 13.08.88. Опубл. 21.02.90. // Кокай токке кохо . Сер.3(3).-1990.-25.-с 331-335.

168. Способ получения желатиновых микроносителей для культивирования клеток. А.С.1161548 СССР. МКИ^4 С 12N 5/00. //Грачев В.П., Завальный

М.А., Попова В.Ф. и др. - № 3662903/29-13. Заявл.23.08.83. Опубл. 23.08.87. Бюл.№ 25.

169. Способ получения кератина. Пат. 2092072 Россия. МКИ[6] А 23 К 1/10. // Сапожникова А.И, Каспарьянц С.А., Месропова Н.В. и др. -№95117245/13. Заявл. 06.10.95. Опубл. 10.10.97. Бюл. №28.

170. Способ получения коллагена. Пат. 1709613 Россия. МКИ[6] А 61К 38/17. /Левина О.И., Чернышева Л.З., Истранов Л.П.- № 4801871/14. Заявл. 12.04.90. Опубл. 10.-1.95.

171. Способ получения коллагенового золя. Пат. 2031597 Россия. МКИ[6] А 23J 1/10, С 09Н 1/00, С 14С 1/08. //Каспарьянц С.А., Сапожникова А.И., Месропова Н.В., Гордиенко И.М. и др. -№ 5022810/13. Заявл.12.02.92. Опубл. 27.03.95. Бюл.№9.

172. Способ получения коллагенового материала. А.С. 1622990 СССР. МКИ[4] А 63 К 37/00, С 14С 1/08. //Каспарьянц С.А., Хачиянц В.И., Сапожникова А.И. и др. - № 4400803/13. Заявл.30.03.88. Зарегистр. 22.09.90. Для служебн. польз.

173. Способ получения коллазоля. Пат. 2129805 Россия. МКИ[6] А 23J 1/10, С 09Н 1/00, 3/00, С 14С 1/08. // Сапожникова А.И., Каспарьянц С.А., Белевцова Д.В. - № 97121210/13. Заявл. 30.12.97. Опубл. 10.05.99. Бюл. № 13.

174. Способ получения микроносителей для культивирования клеток. Пат. 2007451 Россия. МКИ[5] С 12 N 5/00. // Сапожникова А.И., Акопян В.Б., Каспарьянц С.А. и др. - №5016591/13. Заявл. 28.12.91. Опубл. 15.02.94. Бюл. №3.

175. Способ получения микрочастиц коллагена. Заявка 0351296 ЕПВ. МКИ[5] А 61К 47/00,9/16. //Публ. 17.01.90. Бюл.№ 1

176. Способ получения молекулярно-растворимого кератина "кератана": Пат. 2113225 Россия, МПК[6] А 61К 36/36 /Хачиянц В.И.- № 95114155/14. Заявл. 09.08.95. Опубл.20.6.98.

177. Способ получения полифункционального коллагенового препарата. Пат. 2059383 Россия. МКИ[6] А 23J 1/10, С 09Н 1/10, 3/00. //Вайнерман Е.С., Куланова В.Н., Курская Е.А., Павлова Л.А., Далигаян Л.Г., Крайнюк Л.Н. - №

92008487/13. Заявл. 12.11.92. Опубл. 10.5.96. Бюл.№14.

178. Способ получения пористо-волоконного материала: Заявка 95122016 Россия МПК^6 С14С 13/00 – Калинина Е.В., Семенова Н.Н., Рогожин С.В., Лозинский В.И. - №95122016/12, Заявл.25.12.95; Опубл. 10.12.97, Бюлл. №34.

179. Способ получения пористого коллагенового материала. Пат. 2061051 Россия. МКИ^6 С14С 1/00. // Вайнерман Е.С., Курская Е.А., Куланова В.К., Подорошно Е.А. - №93049277/12. Заявл.28.10.93. Опубл. 27.5.96. Бюл. №15.

180. Способ получения стерильной коллагеновой основы "фибрикол". Пат. 2118168 Россия. МПК^6 А 61К 38/39, С 08L 89/00. / Истранов Л.П., Абоянц Р.К., Истранова Е.В.- № 96119480/14. Заявл. 27.09.96. Опубл. 27.08. 98. Бюл.24.

181. Способ получения сыворотки, обладающей биостимулирующей активностью. Авторское свидетельство 1474921 СССР. МКИ^4 А 61 К 39/03. //Шестаков В.А., Кузин М.И., Иванченко В.А., Марчук А.И. 1988.

182. Способ получения эластина. Пат. 2092071 Россия. МКИ^6 А 23 К 1/10. // Сапожникова А.И, Каспарьянц С.А., Месропова Н.В. и др. -№95117244/13. Заявл. 06.10.95. Опубл. 10.10.97. Бюл. №28.

183. Султаева Н.Л. Разработка научно-практических основ кулинарного использования сырья с высоким содержанием коллагена. // Автореф. дисс. на соискание ученой степени канд. техн. Наук.- М.-1998.-22с.

184. Сыченников И.А., Абоянц Р.К., Дронов А.Д., Истранов Л.П., Николаев А.В., Шехтер А.Б. Коллагенопластика в медицине. // М.- Медицина.- 1978.- 256 с.

185. Тенцова А.И. Применение синтетических полимерных материалов в фармакологической практике. / Научный обзор.// М.- МЗ СССР, ВНИИ мед. и мед.-тех. инф.-1975.-117 с.

186. Тенцова А.И., Ажгихин Н.С. Лекарственная форма и терапевтическая эффективность лекарств. // М.- Медицина.-1974.-120 с.

187. Топорова И.В. Основные технологические параметры пряжи, обработанной шлихтовальным раствором на основе коллагена. //Вопросы улучшения

качества и рационального использования сырья животного происхождения и продуктов животноводства. / Межвед. сб. научн. трудов. / МВА.-1990.-с.98 – 100.

188. Туманов А.К. Основы судебно-медицинской экспертизы.// М.: Медицина.-1976.-с.308-382.

189. Туманян В.Г. Структура фибриллярных биополимеров. Полиморфизм и проблема биологически значимых структур.// Автореферат дисс. на соискание ученой степени д-ра физ.-мат. наук. –М.-1985.- с.47.

190. Уайт А., Хендлер Ф., Смит Э., Хилл Р., Леман И. Основы биохимии: в 3-х томах. Т.3. гл. 38. // М.- Мир.- 1981 –с.1467-1498.

191. Уруджев Р.С. Химическая усадка коллагена. //М.- Легкая индустрия.-1976.-с.183.

192. Утилизация кожевенных отходов и эффективность их использования в народном хозяйстве.// Кожевенная промышленность. Обзорная информация, вып.2. / М.- ЦНИИТЭИлегпром.- 1991.

193. Френкель С.Я., Гинзбург Б.М. Структурная механика ориентированных полимерных систем. //В кн. «Проблемы физико-химической механики волокнистых и пористых дисперсных систем". – Рига.- Зинатне.-1967.-с.45-80.

194. Фридрихсберг Д.А. Курс коллоидной химии./ Учеб.для вузов. //Л.- Химия.- 1984.- 368 с.

195. Фролов Ю.Г. Курс коллоидной химии. Поверхностные явления и дисперсные системы. // М.- Химия.-1989.- с.464.

196. Хачиянц В.И., Каспарьянц С.А., Нетребенко С.В., Сапожникова А.И. Новые методы оценки качества шовных материалов из животного сырья. //Актуальные проблемы производства кровезаменителей, консервантов крови, гормональных и органотерапевтических препаратов. /Тезисы докладов III Всесоюзной научно-технической конференции.-М.- ВНИИТКГП.-1987.-с.219.

197. Хачиянц В.И., Сапожникова А.И. Анализ химического состава различных видов кишечного сырья. // Теория и практика товароведения и рациональное

использование сырья и продуктов животноводства. /Межвед. сборник науч. трудов.-М.-МВА.-1987.-с.95-98.

198. Хачиянц В.И., Сапожникова А.И. Изменение химического состава кератинсодержащих отходов в процессе их растворения. //Вопросы улучшения качества и рационального использования сырья животного происхождения и продуктов животноводства. / Межвед. сб. научн. Трудов. / МВА.-1990.-с.93 – 95.

199. Хачиянц В.И., Сапожникова А.И., Хачиянц Т.Ю. Изменение свойств сырья в процессе получения кетгута. // Вопросы улучшения качества и рационального использования сырья животного происхождения и продуктов животноводства. /Межвед. сб. науч. трудов. / М.-МВА.-1988.-с.122-124.

200. Хаяси Т. Многообразие форм и действия коллагена. //Гэндай кагаку.-1981.- №120.- с.26-84 (перевод №Д-23857.- ВЦП.- М.- 1982).

201. Хилькин А.М. Коллаген и его применение в медицине.// М.- 1976.- с.256.

202. Химия и технология кожи и меха.// под ред.Страхова И.П.- М.- Изд. "Легкая индустрия".- 1985.- 495 с.

203. Чиркина Т.Ф., Васильева Э.Б. Новые подходы в использовании эластической ткани. // Известия вузов. Пищ. технол. – 1993.- №3-4.-с.10-11.

204. Шрагин И.С., Авидон А.М.: Переработка отходов кожевенного производства – технологические и экономические аспекты проблемы. Кожевенно-обувная промышленность, 1993, №8, С.24-26.

205. Штельцель Т., Файгель Т., Деринг Э. Производство раствора дезамидоколлагена из свиных шкур. // Кожевенно-обувная промышленность.-1991.-№1.-с.32-34.

206. Шульга В.И., Конев В.Д. Современные колбасные оболочки "Кутизин". //Мясная индустрия.-1998.- №4.-с.41-42.

207. Эрнандес Е.И., Сапожникова А.И. Липидные структуры человеческих волос.// Косметика и медицина.- 1997.- №1.- с.23-26.

208. Additive for hair treatment compositions. Pat. 4906460 USA. МКИ^4 A 61K 7/06, A 61K 7/09. / Kim W.W., Kondoll Sh.Z. -№228998. Заявл. 08.08.88.

Опубл. 06.08.90.

209. Ahmadi B., Boston N.M., Dobb M.G., Speakman P.T. Possible four-chain repeating unit in the microfibril of wool. /In: Fibrous proteins: scientific, industrial and medical aspects. //- Ed. by Parry D.A.D., Creamer L.K. – New York-London. Academic Press.- 1979.- v.1.-pp.161-166.

210. Ahmadi B., Speakman P. T. Polyacrylamide gel electrophoresis in the presence of sodium dodecylsulfate in wool protein purification and relative molecular mass determination. // Proc. Anal. Div. Chem. Soc. – 1979. – v.16. – pp.236-238.

211. Alitalo K., Kurkinen M., Vaheri A., Krieg T., Timpl R. Extracellular matrix components synthesized by human amniotic epithelial cells in culture. //Cell.- 1980.- v.19.- pp.1053-1062.

212. Alitalo K., Vaheri A., Kreig T., Timpl R. Biosynthesis of two subunits of type IY procollagen and other basement proteins by a human tumor cell line. // Europ.J. Biochem.-1980.-v.109.- pp.247-255.

213. Allen A.K., Ellis J., Riven D.E. The presens of glycoproteins in cell membrane complex of a variety of keratin fibers. //Biophys. Biochim. Acta.- 1991.-v.1074, № 2.- pp. 331-333.

214. Anderson J.C. Glycoproteins of connective tissue matrix. / In: Int. Rev.of Connect. Tissue Res./Ed. by Hall D.A., Jacksoon D.S. // Academic Press.-New York-London. –1976. – v.7.- pp. 251-323.

215. Applying principal components analysis to the aminoacid composition of keratin materials. // Text. Res. J. – 1995.- v.65, №11.- pp.669-675.

216. Asquith R.S. Reactivity of chemical groups in keratin. / In: Biochemistry of collagen. //Ed. by Ramachandran G., Reddi A.- New York – London, Plenum Press.-1976. –pp.371-392.

217. Baden H.P. Das haarkeratin. /In: Haar und Haarkrankheiten. //Ed. by C. E. Orfanos.// Fisher Verlag.- Stuttgart.- 1979.- pp. 23-50.

218. Baer Eric. Hierarchical structure of collagen composite systems / lessons from biology. // 33 rd IUPAC Int. Symp. Macromol. Montreal, July 8-13, 1990./ Book Abstr/ - Montreal.- 1990. – p.1.

219. Banga I. Structure and function of elastin and collagen. // Budapest, Academ. Kiado. – 1966.- 225 p.

220. Baranauskas V., Vidal B.C., Parizotto N.A. Observation of geometric structure of collagen molecules be atomic force microscopy. // Appl. Biochem. And Biotechnol. F. –1998.-v.69, №2.- pp.91 -97.

221. Baumann H. Applied aspects of keratin chemistry. / In: Biochemistry of collagen. //Ed. by Ramachandran G., Reddi A.- New York – London, Plenum Press.- 1976. –pp.299-370.

222. Bendit E.G., Distribution of protein fraction in alpha keratin structure. /In: Simpozium on fibrous proteins. / Ed. by Crewther W.C.// New York.-Plenum Press.-1968.-pp.341-342.

223. Bendit E.G., Gillespie J.M. The probable role and location of high-glycine-tyrosine proteins in the structure of keratins. //Biopolymers. - 1978.- v.17. - pp. 2743-2745.

224. Berg A., Echmayer Z., Smith S. Elastin. // Cosmetics a. Toilet.- 1979.- v.94.- pp.23-38.

225. Bernath F.R., Vieth W.R. Collagen as a carrier for enzymes: material science and process engineering aspects of enzyme engineering. /In: Immobilized enzymes in food and microbial processes. // Ed. by A.C. Olson, C.L. Cooney.- 1974.-v.1.- pp.157-185.

226. Bersaques J. D. Keratin and its formation. // Curr. Probl. Dermatol.- 1976.- v.6.- pp. 34-86.

227. Bhatnagar R.S., Rapaka R.S. Synthetic polypeptide models of collagen. /In: Fibrous proteins: scientific, industrial and medical aspects. //- Ed. by Parry D.A.D., Creamer L.K. – New York-London. Academic Press.- 1979.- v.1.-pp.133-150.

228. Block R.J. Chemical classification of keratins.// Am. N.Y. Acad. Sci.- 1951.- v.53.- pp.608-612.

229. Bradbury J.H., Chapman E.V., King L.R. Chemical composition of the histological components of wool. /In: Simpozium on fibrous proteins. / Ed. by

Crewther W.C.// New York.-Plenum Press.-1968.-pp.368-372.

230. Bruns R. Supramolecular structure of polymorphic collagen fibrils. / J.Cell Biol. – v.68.- pp.521-538.

231. Buchanan J.H. A cystine-rich fraction from oxidized α-keratin.// Biochem. J. – 1977.- v. 167.- pp. 489-491.

232. Burgeson R.E., Holister D.W. Collagen heterogenity in human in human cartilage. //Biochem. Biophys. Res. Commun. –1979.-v.87, №4.- pp.1124-1131.

233. Caloianu-Jordachel M., Angel G., Georghe V. Molecular heterogenity of differently solubilized collagen as revealed by isoelectrical focusing .// Rev. Reum. Biochim.- 1979.- v.16, №3.-pp.183-185.

234. Cao Jian . Origin of the bimodal "Melting" endotherm of α-form crystallites in wool keratin. // J. Appl. Polym. Sci.- 1997.-v.63, №4.-pp.411-415.

235. Carnes W. Morphology of elastin and elastic tissue. /In: Advances in experimental medicine and biology. – v.79. / Elastin and elastic tissue. //Ed. by Sandberg L.B., Gray W.R., Franzblau C. // Plenum Press. New York-London. 1977.- pp.603 -606.

236. Chen J.M., Fearheller S.H., Brown E.M. Three-dimensional-energy minimized models for calf skin type1 collagen triple helix and microfibril. 1. The triple helical models. II. The "Smith" microfibril. //J. Amer. Leather Chem.-1991.-v.86, №12.-pp.475-486, 487-498.

237. Chvapil M. Industrial users of collagen. / In: Biochemistry of collagen. //Ed. by Ramachandran G., Reddi A.- New York – London, Plenum Press.-1976. –pp.247-269.

238. Claire K., Pecora R. Translational and rotational dynamics of collagen in dilute solution. // J. Phys. Chem. B. –1997.-v.101, №5.-p.5.-pp.746-753.

239. Cleary E.G, Gilson M.A. Elastin-associated microfibrils and microfibrillar proteins. glycoprotein extracted from fetal bovine ligamentum nuche. – Int. Rev. Connect. tis. -1983.- 10. – pp. 97-209.

240. Cleary E.G, Gilson M.A., Fanning J.C. The microfibrillar component of elastic tissue. / In: Elastin and elastases. // Ed. Robert L., Hornebeek W.- CRC Press. –

1989. – v.1.- pp.31-48.

241. Cleary E.G. Comparison of the development of 2 elastin-rich tissues in ship. Meeting abstract.- Connect. tis. -1981.- 8, N 3-4. – pp.135-136.

242. Collagen extracted from collagen-containing tissue. Пат.5064941 США. МКИ[5] А 61К 37/12, С 07К 15/20, С 08Н 1/06. //Daviason P.F. Boston Biomedical Research Institute.- №583324. Заявл.26.09.90. Опубл.12.11.91.

243. Collagen-containing sponges as drug delivery composition of proteins. Пат. 5512301 США. МКИ[6] А 61К 9/14. //Song-Zu., Morawievski A. / Amgen Inc. - №348276. Заявл. 30.11.94. Опубл. 30.04.96.

244. Collagen-polymer conjugates. Пат. 5413791 США. МКИ[6] А 61 F 2/00, 13/00. // Rhee W., Wallace D.C., Michaelis A.S., Burhs R.A. /Collagen Corp. - №198128. Заявл. 17.02.94. Опубл. 09.05.95.

245. Compozitic de impregnare a materialelor textile. Пат. 98098. Румыния. МКИ[4] D 06 3/10, D06M 15/693. // Bucevschi M.D., Chirita Gheorghe; Institutul Polytehnic. - № 128311. Заявл.21.05.87. Опубл. 23.02.90.

246. Connective tissue matrix (Topics in molecular and structural biology, 5). / Ed. by Hukins D.W.L. //Verlag Chemie.- 1984. – pp.245

247. Cosmetic preparations comprising novel elastin derivates. Пат. 4659470. США. МКИ[4] А 61К 7/48; С 09F 7/00. Usher T.C.- Polydex Pharmaceuticals Ltd.- № 701960. Заявл. 14.2.85.; Опубл. 21.4.87.

248. Cotta-Pereira G., Guerra R.F., David-Ferreira J.F. The elastic system fibers. /In: Advances in experimental medicine and biology. – v.79. / Elastin and elastic tissue. //Ed. by Sandberg L.B., Gray W.R., Franzblau C. // Plenum Press. New York-London. 1977.- pp.19-30.

249. Cotte J., Dumas H. Le collagene et ses possibilites technologiques. //J.pharm. belg.- 1991.- v.46, №3.-pp.201-210.

250. Crewther W.G. Primary structure and chemical properties of wool.// Proc. Fifth Int. Wool Test. Res. Conf. - Aachen.- 1976. – v. 1.- pp. 1-101.

251. Crewther W.G., Dowling L.M., Gough K.H., Inglis A.S., McKern N.M., Sparrow L.G., Woods E.F. The low sulfur proteins of wool: studies on their classifica-

tion, characterization, primary and secondary structure.// Proc. Fifth Int. Wool Test. Res. Conf. - Aachen.- 1976. – v. 2.- pp. 233-242.

252. Crewther W.G., Dowling L.M., Gough K.H., Marshall R.C., Sparrow L.G. The microfibrillar proteins of α-keratin. /In: Fibrous proteins: scientific, industrial and medical aspects. //- Ed. by Parry D.A.D., Creamer L.K. – New York-London. Academic Press.- 1979.- v.1.-pp.151-159.

253. Crewther W.G., Dowling L.M., Gough K.H., Marshall R.C., Sparrow L.G. The microfibrillar proteins of α-keratin. / In: Fibrous Proteins, Scientific, Industrial and Medical aspects. / Eds. by D.A.D. Parry and L.K. Creamer.// Academic Press.- London.- 1980b.- pp. 151-159.

254. Crewther W.G., Dowling L.M., Gruen L.C., Sparrow L.G., Woods E.F. Interactions between microfibrillar proteins of wool.// Proc. Sixth Int. Wool Test. Res. Conf. – Pretoria.- 1980.- v.2- pp.1-12.

255. Crewther W.G., Gillespie J.M., Harrap B.S., Inglis A.S. Low-sulfur proteins from α-keratins. // Biopolymers. – 1966.- v.4.- pp.905-916.

256. Crewther W.G., Inglis A.S., McKern N.M. Amino acid sequences of α-helical segments from S-carboxymethylkerateine-A.// Biochem. J. – 1978.- v. 173.- pp. 365-371.

257. Crighton J.C., Happey F. Differential thermal analysis of keratin and related protein fibers. /In: Simpozium on fibrous proteins. / Ed. by Crewther W.C.// New York.-Plenum Press.-1968.-pp.409-420.

258. Davidson J.M., LuValle P.A., Zoia O., Quaglino D.Jr., Giro M. Ascorbate differentially regulates elastin and collagen biosynthesis in vascular smooth muscle cells and skin fibroblasts by pretranslational mechanisms. // J. Biol. Chem.-1997.- v.272, №1. –pp. 345-352.

259. Die biochimie des kollagens und ihre beolentung als wichtige komponente der extrazellularen matrix. //Leder.-1997-v.48, №2.-p.34.

260. Dowling L.M., Gough K.H., Inglis A.S., Sparrow L.G. Comparison of some microfibrillar proteins from wool. //Aust. J. Biol. Sci.- 1979.- v.32.- pp. 437-442.

261. Dunn M.G., Bellincampi L.D., Tria A.J., Zawadsky J.P. Preliminary develop-

ment of collagen-PLA composite for ACL reconstruction. // J.Appl.Polym. Science-1997.-v.63, №11.-pp.1423-1428.

262. Eberhardt E.S., Panasic N., Raines P.T. Inductive effects on the energetic of prolil peptide bond isomerization: Implications for collagen folding and stability. // J. Amer. Chem. Soc.- 1996.- v.118, №49.-pp.12261-12266.

263. Elleman T.C. Lindley H., Rowlands R.J. Periodicity in high-sulfur proteins from wool. // Nature.- 1973.- v.246.- pp.530-531.

264. Famming J.C., Prosser I. Possible pole of microfibrils in elastogenesis. - Connect. tis. -1981.- 8, N 3-4.- pp.161-166.

265. Feng Y., Taulane J.P., Goodman V. Characterization of triple helical structures of synthetic collagen analogs by reverse phase high-performance liquid chromatography. // Macromolecules.-1997-v.20, №12.-pp.2947-2952.

266. Fessler J.N., Fessler L.I. Biosynthesis of procollagen. // Annu. Rev. Biochem. –1978. -v. 47.- pp.129-162.

267. Field J.M., Rodger R.M., Hunter J.C. Isolation of elastin from bovine auricular cartilage. /Arch. Biochem. Biophys.- 1978.-191, №2.-pp.705-713.

268. Fietzek P.P., Kuhn K. The primary structure of collagen./ In: Int. rev.of connect. tissue res./Ed. by Hall D.A., Jacksoon D.S. // Academic Press.-New York, London. –1976. – v.7.- pp.1-60.

269. Folin M., Contiero E. Electrophoretic analysis of mammalian hair keratins. // Anthropol. Anz.-1996.-v.54, №4.-pp.331-339.

270. Foster J.A., Mecham R., Imberman M., Faris B, Franzblau C. A high molecular weight species of soluble elastin – proelastin. /In: Advances in experimental medicine and biology. – v.79. / Elastin and elastic tissue. //Ed. by Sandberg L.B., Gray W.R., Franzblau C. // Plenum Press. New York-London. 1977.- pp.351-372.

271. Fox C. Cosmetic raw materials. Literature and patent review 1988-1990. // Cosmetic and Toilet.-1990.-v.105, №8.-pp. 77-82, 84-86, 88-90, 92-94,96.

272. Franzblau C., Foster J.A., Faris B. Role of crosslinking in fiber formation. /In: Advances in experimental medicine and biology. – v.79. / Elastin and elastic tissue. //Ed. by Sandberg L.B., Gray W.R., Franzblau C. // Plenum Press. NewYork-

London. 1977.- pp.313-342.

273. Fraser R.D.B., MacRae T.P., Parry D.A.D. Substructure of alpha keratin microfibril. /In: Simpozium on fibrous proteins. / Ed. by Crewther W.C.// New York.-Plenum Press.-1968.-pp.279-286.

274. Fraser R.D.B. The structure of fibrous proteins. / In: Proc. First Cleveland Symposium on Macromolecules.//Ed. by A.G. Walton.// Elsevier.- New York.- 1977.- pp.1-21.

275. Fraser R.D.B., Gillespie J. M., MacRae T.P. Tyrosine-rich proteins in keratins.// Comp. Biochem. Physiol. – 1973.- v.44B.- pp. 943-947.

276. Fraser R.D.B., MacRae T.P. Molecular structure and mechanical properties of keratins ./ In: The mechanical properties of biological materials./ Ed. by J.F.V. Vincent and J.D. Currey.// Society for Experimental Biology.- London.- 1980. – pp.211-246.

277. Fraser R.D.B., MacRae T.P., Rogers G.E. Keratins: their composition, structure and biosynthesis. // Ed. by I.N. Kugelmass.- Charles C. Thomas.- Springfield.- Ill. – 1972.- pp.52-54.

278. Fraser R.D.B., MacRae T.P., Suzuki E. The molecular and fibrilar structure of collagen. / In: Biochemistry of collagen. //Ed. by Ramachandran G., Reddi A.- New York – London, Plenum Press.-1976. –pp.179-206.

279. Fuchs E. Keratins and the skin. // Ann. Rev. Cell Dev. Biol.- 1995. -v.11.- pp.123-153.

280. Fulop T., Jacob M.P., Robert L. Biological effects of elastin peptides. / In: Elastin and elastases. // Ed. Robert L., Hornebeek W.- CRC Press. – 1989. – v.1.- pp.201-212.

281. Furthmar H., Timpl R. Immunochemistry of collagens and procollagens. / In: Int. rev.of connect. tissue res./Ed. by Hall D.A., Jacksoon D.S. // Academic Press.- New-York, London. –1976. – v.7.- pp.61-101.

282. Gay S., Miller E.J. What is collagen, what is not? // Ultrastruct. Pathol.- 1983.- v.4, №5.- pp.703-707.

283. Gillespie J. M. Proteins rich in glycine and tyrosine from keratins.// Comp.

Biochem. Physiol. – 1972a.- v.41B. – pp.723-734.

284. Gillespie J. M. The high-sulfur proteins of normal and aberrant keratins. / In: Biology of the skin and hair growth./Eds. by A.G. Lyne and B.F. Short.// Angus & Robertson.- Sydney.- 1965. – pp. 377-398.

285. Gillespie J. M., Frenkel M.J. The diversity of keratins.// Comp. Biochem. Physiol. – 1974b. – v.47b. –pp. 339-346.

286. Gillespie J. M., Haylett T., Lindley H. Evidence of homology in a high-sulfur protein fraction (SCMKB-2) of wool and hair α-keratins. // Biochem. J. – 1968. – v. 110. – pp.193-200.

287. Gillespie J. M., Marshall R.C. The proteins of human hair and nail.// Proc. 10th Int. Fed. Soc. Cos. Chem. – 1978. – v.3. – pp. 559-575.

288. Gillespie J. M., Marshall R.C. The proteins of normal and aberrant hair keratins./ In: Hair research./ Eds. by C.E. Orfanos. W. Montagna, G. Stuttgen.// Springer Verlag.- Heidelberg. –1981. – pp. 76-83

289. Gillespie J. M., Marshall R.C. Variability in the proteins of wool and hair.// Int. Wool Test. Res. Conf. – Pretoria. – 1980. – v.2.- pp. 67-77.

290. Gillespie J.M. The structural proteins of hair: isolation, characterization and regulation of biosynthesis. /In: Biochemistry and physiology of the skin. Part III. Dermal macromolecules and their metabolism. / Ed. by Goldsmith L.A. // Oxford Univ. Press.- 1983. – v.1.- pp. 475-510.

291. Gold. R.J.M., Tenenhouse H.S., Adler L.S. A method of calculating the relative protein contents of the major keratin components from their amino acid composition. // Biochem. J. – 1976.- v. 159. - pp. 157-160.

292. Goodman M., Melacini G., Feng Y. Collagen-like triple helices incorporating peptoid residues. // J. Amer. Chem. Soc.- 1996.- v. 118, №44.- pp.10928-10929.

293. Gosline J.M. The physical properties of elastic tissues. / In: Int. rev.of connect. tissue res./Ed. by Hall D.A., Jacksoon D.S. // Academic Press. New York- London. –1976. – v.7.- pp. 211-250.

294. Gosline J.M. The role of hydrophobic interactions in the swelling of elastin. /In: Advances in experimental medicine and biology. – v.79. / Elastin and elastic

tissue. //Ed. by Sandberg L.B., Gray W.R., Franzblau C. // Plenum Press. NewYork-London. 1977.- pp.621 -632.

295. Gotte L. Molecular morphology of elastin. / In: Frontiers of matrix biology. // Ed. by L. Robert. – Basel.-1980.-v.8.- pp.35-53.

296. Gotte L. Recent observations of the structure and composition of elastin. /In: Advances in experimental medicine and biology. – v.79. / Elastin and elastic tissue. //Ed. by Sandberg L.B., Gray W.R., Franzblau C. // Plenum Press. New York-London. 1977.- pp.105-118

297. Gough K.H., Inglis A.S., Crewther W.G. Amino acid sequences of α-helical segments from S-carboxymethylkerateine-A. Complete sequence of a Type I segment.// Biochem. J. – 1963.- v. 173. - pp. 373-385.

298. Granvill R.W., Kuhn K. The primary structure of collagen. /In: Fibrous proteins: scientific, industrial and medical aspects. //- Ed. by Parry D.A.D., Creamer L.K. – New York-London. Academic Press.- 1979.- v.1.-pp.133-150.

299. Gray W.R. Molecular models for elastin structure and function. /In: Advances in experimental medicine and biology. – v.79. / Elastin and elastic tissue. //Ed. by Sandberg L.B., Gray W.R., Franzblau C. // Plenum Press. New York-London. 1977.- pp.743-757.

300. Guisti P., Barvani N., Lazzeri L., Lelli L. Bioartifical polymeric materials. //J. Macromol. Sci. A.-1994.-v.31, suppl. 6-7.-pp.839-847.

301. Harada O., Sumita S., Sugita M., Yamamoto T. Characterization of collagen by capillary electrophoresis. //Bull. Chem. Soc. Jap. – 1996.- v.69, №12.- pp.3575-3579.

302. Hardy D., Baden H.P. Biochemical variation of hair keratins in man and nohuman primates. // Am. J. Phys. Anthropol. – 1973.- v. 39. – pp. 19-24.

303. Harkness R.D. Mechanical properties of connective tissues in relation to function. / In: Biochemistry of collagen. //Ed. by Ramachandran G., Reddi A.- New York – London, Plenum Press.-1976. –pp.207-211.

304. Hoeve C.A.J. The elasticity in the presence of diluents. /In: Advances in experimental medicine and biology. – v.79. / Elastin and elastic tissue. //Ed. by

Sandberg L.B., Gray W.R., Franzblau C. // Plenum Press. New York-London. 1977.- pp. 607-620.

305. Hoeve C.A.J., Flory P. The elastic properties of elastin. //Biopolymers. - 1974. -v.13.-pp.677-682.

306. Holbrook K.A., Byers P.H. Skin as a window on heritable disorders on connective tissue. // Am. J. Med. Genet. –1989.-v.34, №1, pp.105-121.

307. Holmgren S.K., Taylor K.M., Bretscher L.E., Raines P.T. Code for collagens stability deciphered. // Nature. – 1998.- v.302, b. 677.-pp.666-667.

308. Hynes R.O. Fibronectins. //Academic Press.-NewYork.-1990.-545 p.

309. Itoh T., Tsuchiya H., Yasukava M., Hashimoto V., Konishi T.Quantitative structural analisis for the air dried collagen fibrils of rat-tall-tendon on the basis of transmission-electron-microscopic image. //Sen-i gakkaishi=Fiber.-1995.- №11.-pp.511-516.

310. Jacob M.P., Fulop T., Robert L. Immunological properties of elastin. / In: Elastin and elastases. // Ed. Robert L., Hornebeek W.- CRC Press. – 1989. – v.1.-p.187-200.

311. Jacob M.P., Robert L. Isolation, characterization and biochemical properties of elastin. / In: Elastin and elastases. // Ed. Robert L., Hornebeek W.- CRC Press. – 1989. – v.1.- pp.50-65.

312. Jeyanthi R., Rao K., Panduranda S. Controlled release of anticancer drugs from collagenpoly(HEMA)hydrogel matrices. // J.Cjntr/ Release.-1990.-v.13, №1.-pp.91-98.

313. Jones L.N. Investigations of structural proteins in human hair defects using anagen follicles. // Br. J. Dermatol. –1996.- v.135, №1.-pp.80-85.

314. Jones L.N. Studies on microfibrils from α-keratin. // Biochim. Biophys. Acta.-1976.- v.446.- pp. 515-524.

315. Jones L.N. The isolation and characterization of α-keratin microfibrils.// Biochim. Biophys. Acta.- 1976.- v.412.- pp. 91-98.

316. Kadar A. Scanning electron microscopy of purified elastin with and without enzymatic digestion. /In: Advances in experimental medicine and biology. – v.79.

/ Elastin and elastic tissue. //Ed. by Sandberg L.B., Gray W.R., Franzblau C. // Plenum Press. New York-London. 1977.- pp.71-96.

317. Kadar A. Ultrastructural properties of elastin./ In: Elastin and elastases. // Ed. Robert L., Hornebeek W.- CRC Press. – 1989. – v.1.- pp.21-30.

318. Kagan H.M. Posttranslational modification of elastin: lysine oxidation and cross-linking. - / In: Elastin and elastases. // Ed. Robert L., Hornebeek W.- CRC Press. – 1989. – v.1.- pp.109-126.

319. Katz E.P., David C.W. Energetic of intrachain salt-linkage formation in collagen. //Biopolymers.-1990.-v. 29, №4-5.-pp.791-798.

320. Kearns J.E., MacLaren J.A. Lanthionin cross-links and their effects in solubility tests on wool. //J. Text. Inst.-1979.-v.79.-pp.534-536.

321. Keith D.A., Paz M.A., Gallop P.M. Elastic tissue histochemistry. /In: Advances in experimental medicine and biology. – v.79. / Elastin and elastic tissue. //Ed. by Sandberg L.B., Gray W.R., Franzblau C. // Plenum Press. New York-London. 1977.- p.p57-60.

322. Keller S., Mandl I. Peptides derived from the non - crosslinked regions of elastin. /In: Fibrous proteins: scientific, industrial and medical aspects. //- Ed. by Parry D.A.D., Creamer L.K. – New York-London. Academic Press.- 1979.- v.1.-pp.113-140.

323. Kennedy J.F. Chemical and biochemical aspects of the glycosaminoglycans and proteoglycans in health and disease. // Advance Clin. Chem.- 1976.- v.18.- pp.1-101.

324. Kitano Y., Saito K., Okamoto E., Okano Y., Ito M. In vitro keratin expression of hair cells.// J. Dermatol.-1992. v.19, №11.-pp.793-796.

325. Knigh K.R., Grant M.E., Jackson D.S. Identification of a putative microfibrillar glycoprotein extracted from fetal bovine ligamentum nuche. - Connect. tis. - 1983.- v.11, № 2-3.- pp. 230-231.

326. Kollagen als hydroplastishes polyampholytmaterial. //Leder.-1997-v.48,№2.- p.34.

327. Kompozitni material na bazi kolagenu.Пат. 281496 Чехия. МКИ^{6} A 61K

38/39, 38/19.// Adaue Milan./Reumatologisky Ustav, Praha, Cz.- №1892-94. Заявл. 04.08.94. Опубл.16.10.96.

328. Kronick P., Maleff B. Uneven natural cross-lining in hide fibrils. // J.Amer. Leather Chem. Assoc.-1990.-v.85, №4.-pp.122-127.

329. Lapiere C.M., Nusgens B.V. The extracellular matrix and its regulation. // Pathol. Biol.- 1992.- v.40, № 2.-pp.133-138.

330. Lapiere Ch. M., Nusgens B. Collagen pathology at the molecular level. / In: Biochemistry of collagen. //Ed. by Ramachandran G., Reddi A.- New York – London, Plenum Press.-1976. –pp.377-426.

331. Lee L.D., Baden H.P. Organization of the polypeptide chain s in mammalian keratin. // Nature.-1976.- v.264.-pp.377-378.

332. Light N.D., Bailey A.J. Covalent crosslink in collagen. /In: Fibrous proteins: scientific, industrial and medical aspects. //- Ed. by Parry D.A.D., Creamer L.K. – New York-London. Academic Press.- 1979.- v.1.-pp.151-177.

333. Lindley H. The chemical composition and structure of wool. /In: Chemistry of natural protein fibres. //Ed. by R.S. Asquith . –Plenum Press.-New York.-1977.-pp.147-191.

334. Mandl I., Darnule T,V. Fierer J.A., Keller S., Turino G.M. Elastin degradation in human and experimental emphysema. /In: Advances in experimental medicine and biology. – v.79. / Elastin and elastic tissue. //Ed. by Sandberg L.B., Gray W.R., Franzblau C. // Plenum Press. New York-London. 1977.- pp.221-232.

335. Marggrander K. Collagenous proteins as exipients for the improvement of the technological and sensory properties of meat productsand ready meals. // Fleish-wirtshaft. –1996.-v.76, №7.-pp.746-753.

336. Marshall R.C. Analyses of the proteins from single wool fibres by two-dimensional polyacrilamide gel electrophoresis. //Text.Res. J.-1981.-v.51.-pp.106-108.

337. Marshall R.C., Blagrove R. J. Successful isoelectric focusing of wool low-sulfur proteins. //J. Chromatogr. –1979.- v.172.-pp.351-356.

338. Marshall R.C., Frenkel M.J., Gillespie J.M High- sulfur proteins in mammal-

ian keratins: a possible aid in classification. // Aust. J. Zool.-1977.-v25.-pp.121-132.

339. Marshall R.C., Gillespie J.M, Inglis A.S., Frenkel M.J. High-tyrosine proteins of wool, heterogenity and biosynthetic regulation. // Proc. Sixth Int. Wool Text. Res. Conf.- Pretiria.-1980.-v.2.-pp.147-158.

340. Marshall R.C., Gillespie J.M. Heterogeneity and incomplete disulfide reduction in the high sulfur proteins of wool. //Aust. J. Biol. Sci. –1978.-v.31.-pp.219-229.

341. Marshall R.C., Orwin D.F., Gillespie J.M. Structure and biochemistry of mammalian hard keratin. //Electron Microsc. Rev.- 1991.-v.4, №1.-pp. 47-83.

342. McCrum F. The molecular conformation of elastin as derived from mechanical investigations. /In: Advances in experimental medicine and biology. – v.79. / Elastin and elastic tissue. //Ed. by Sandberg L.B., Gray W.R., Franzblau C. // Plenum Press. New York-London. 1977.- pp.633-644.

343. Mecham R., Foster J.A., Franzblau C. Proteolysis of tropoelastin. /In: Advances in experimental medicine and biology. – v.79. / Elastin and elastic tissue. //Ed. by Sandberg L.B., Gray W.R., Franzblau C. // Plenum Press. New York-London. 1977.- pp.209-220.

344. Melacini G., Feng Y., Goodman M. Acetyl-terminated and template collagen-based polypeptides composed of Gly-Pro-Hyp sequences. Conformational analyses by ^{1}H-NMR and molecular modeling studies. // J. Amer. Chem. Soc.- 1996.-v.118, №43.-pp.10359-10364.

345. Method of augmenting tissue using collagen-polymer conjugates. Пат. 5376375 США. МКИ^{6} A 61F 13/00. Collagen Corp.- №177578. Заявл.05.01.94. Опубл. 27.01.94

346. Method of preparing collagen dressing sheet material. Пат. 4948540 США МКИ^{5} C08J 89/00 B29B 13/04. // Nigam Alok- № 229069, Заявл. 01.08.88. Опубл. 14.08.90.

347. Mier P.M., Cotton D.W.K. Structural proteins. / In: The molecular biology of skin.//Oxford. – 1976.- pp.79-106.

348. Mies H.H., Zahn H. Praparative loslicher proteine aus woole. // Leder.-1988.- v.39, №1.-pp.1-9.

349. Miller A. Molecular parking of collagen fibrils./ In: Biochemistry of collagen. //Ed.by Ramachandran G., Reddi A. -New-York – London, Plenum Press.-1976. – pp.85-136.

350. Miller E.D. Biochemical characteristics and biological significans of the genetically distinct collagens. //Mol. Cell. Biochem. –1976.- v.13., №3.- pp.165-192.

351. Molecular and developmental biology of keratins. / In: Current topics in developmental biology. // Ed. Moscona A.A., Monroy A.- Academic Press. - 1987. – v.22. – pp.245.

352. Muir H. Proteoglycans as organizers of the intercellular matrix. – Biochem. Soc. Transpl. – 1983. – 13, №3, pp.281-292.

353. Nishikawa N., Tanizawa Y., Tanaka Sh., Horiguchi Y., Matsuno H., Asakura T. PH dependence of the coiled-coil structure of keratin intermediate filament in human hair be ^{13}cNMR spectroscopy and the mechanism of its disruption. //Polym.J.- 1998.- v.30, №2.- pp.125-132.

354. Oddy V.H., Annison E.F. Possible mechanisms by which physiological state influences the rate of wool growth. /In: Physiological and environmental limitations to wool growth. // Eds. by Black J.L., Reis P.J.- Univ. New England Publ. Unit.-1979.-pp.295-309.

355. Oikarinen A. Aging of the skin connective tissue: how to measure the biochemical and mechanical properties of aging dermis. // Photodermatol. Protoimmunol. Photomed.- 1994.- v.10, №2. – pp.47-52.

356. Orwin D.F.G. Cytological studies on keratin fiber. / In: Biochemistry of collagen. //Ed. by Ramachandran G., Reddi A.- New York – London, Plenum Press.- 1976. –pp.271-298.

357. Orwin D.F.G. Cytological studies on keratin fibres. / In: Fibrous proteins: scientific, industrial and medical aspects. // Ed. by Parry D.A.D., Creamer L.K. – New York-London. Academic Press.- 1979.- v.1.-pp.271-297.

358. Parks W.C., Mecham R.P. Influence of extracellular matrix on elastin biosynthesis. / In: Elastin and elastases. // Ed. Robert L., Hornebeek W.- CRC Press. – 1989. – v.1.- pp.213-228.

359. Parry D.A.D. Determination of structural information from the amino-acid sequences of fibrous proteins/In: Fibrous proteins: scientific, industrial and medical aspects. //Ed. by Parry D.A.D., Creamer L.K. – New York-London. Academic Press.- 1979.- v.1.-p.479-514.

360. Parry D.A.D., Craig A.C., Barnes G.R.G. Fibrillar collagen in connective tissue. /In: Fibrous proteins: scientific, industrial and medical aspects. //- Ed. by Parry D.A.D., Creamer L.K. – New York-London. Academic Press.- 1979.- v.1.- pp.77-88.

361. Partidge S. Physical chemistry of elastin. /In: Advances in experimental medicine and biology. – v.79. / Elastin and elastic tissue. //Ed. by Sandberg L.B., Gray W.R., Franzblau C. // Plenum Press. New York-London. 1977.- pp.603 -606.

362. Partridge S.M. Cross-linking in elastin. / In: Elastin and elastases. // Ed. Robert L., Hornebeek W.- CRC Press. – 1989. – v.1.- pp.127-140.

363. Partuculary hydrolyzed elastin from limed hide trimmings. Пат. 4363760 США, МКИ^3 A 23J 1/10; C 07G 7/06; C 08L 89/06, 89/04; Cioca G. Seton Co.- № 296985. Заявл. 27.8.81. Опубл. 14.12.82.

364. Pharmaceutical composition for the treatment of periodontal disease. Pat. 4906670 USA. МКИ^4 A 61K 9/06. / Higashi K. et al.- №317077. Заявл. 01.03.89. Опубл. 06.03.90. Приор. 25.03.86. №61-67813.(Япония).

365. Pharris B.B. Collagen as biomaterial. // J.Amer. Leath. Chem. Ass.-1980.-v.75, №11.-pp.474-485.

366. Piez K.A., Trus B.L. Collagen primary and high level structure. / Amer.Chem. Soc. Polym. Prepr.-1979.-v.20, №2.-pp.55-58.

367. Pinnel Sh.R., Murad S. Collagen. /In: Biochemistry and physiology of the skin. Part III. Dermal macromolecules and their metabolism. / Ed. by Goldsmith L.A.// Oxford Univ. Press.- 1983. – v.1.- pp. 385-410.

368. Poggi P., Cassasco A., Marchetti C. Ultrastructural localization of elastin-like

immunoreactivity in extracellular matrix around human small lymphatic vessels. // Lymhyology.- 1995. –v.28, №4.-pp.189-195.

369. Pohunkova H., Adam M. Reactivity and the fate of some composite biomaterials based on collagen in connective tissue. // Biomaterials.-1995.-v.16, №1.-pp.67-71.

370. Polymerized collagen –based antifibroid composition. Заявка 2284606 Великобритания. МКИ[6] A 61K 38/39, 31/74. // Fleicher de Leal, Nantzin M.- №9324120. Заявл. 24.11.93. Опубл. 14.06.95.

371. Powell B.C., Rogers G.E. The role of keratin proteins and their genes in the growth, structure and properties of hair.// EXS.-1997.-v.78.-pp.59-148.

372. Procede pour la preparation d' une composition de collagene et compotion ains obtenue. Заявка 2732972 Франция. МКИ[6] C 08H 1/00, 1/06. //Paviot G., Mathe J., Chantard A. / Lab. Mathe S.A. - №9504761. Заявл.14.04.95. Опубл.18.10.96.

373. Process for solubilizing animal hair. Пат. 5276138 США. МКИ[5] C 07K 3/02, C 07K 15/06. // Yamada M., Narita S., Kondo T.et al. - №993522. Заявл. 16.12.92. Опубл. 04.01.94.

374. Ramachandran G., Ramakrishan C. Molecular structure of collagen. . / In: Biochemistry of collagen. //Ed. by Ramachandran G., Reddi A.- New York – London, Plenum Press.-1976. –pp.45-84.

375. Reich G. Structur und reaktivitat des kollagens.// Wissenschaftliche zeitschrift der techischen hochschule "Karl Schorlemmer".-Zeune-Merseburg.-1980.-v.22, №3.- pp.372-382.

376. Reis P.J. Effects of amino acids on the growth and properties of wool. /In: Physiological and environmental limitations to wool growth. // Eds. by J.L. Black, P.J. Reis. –The University of New England Publishing Unit.-1979.-pp.223-242.

377. Rich A., Crick F.H. The molecular structure of collagen. // J. Mol. Biol.-1961.-v.2, №2.-pp.483-488.

378. Robert C., Lesty C., Robert A.M. Aging of the skin: study of elastic fiber network modifications by computerized image analysis. // Gerontology.-1988.- v.34, №5-6.- pp. 291-296.

379. Robert L. Das elastische system der haut. Schicksal der fasern wayrend des alterns. // Parfum. Und Kosmet.-1991.-v.72, №1.- p.8.

380. Robert L., Jacob M.P. Interactions between lipids and elastin. / In: Elastin and elastases. // Ed. Robert L., Hornebeek W.- CRC Press. – 1989. – v.1.- pp.257-286.

381. Rodrigez-Calvo M.S., Carracedo A., Munoz I., Concheiro L. Isoelectric focusing of human hair keratins: correlation with sodium dodecyl sulfate polyacrilamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) patterns and effect of cosmetic treatments. // J. Forensic Sci.- 1992.-v.37, №2.- pp.425-431.

382. Ross R., Fialkov P.J., Altman L.K. The morphogenesis of elastic fibers. /In: Advances in experimental medicine and biology. – v.79. / Elastin and elastic tissue. //Ed. by Sandberg L.B., Gray W.R., Franzblau C. // Plenum Press. New York-London. 1977.- pp.7-17.

383. Ryhanen L., Uitto J. Elastic fibres of the connective tissue. /In: Biochemistry and physiology of the skin. Part III. Dermal macromolecules and their metabolism. / Ed. by Goldsmith L.A.// Oxford Univ. Press.- 1983. – v.1.- pp. 443-447.

384. Sage E.H., Gray W.R. Evolution of elastin structure. /In: Advances in experimental medicine and biology. – v.79. / Elastin and elastic tissue. //Ed. by Sandberg L.B., Gray W.R., Franzblau C. // Plenum Press. New York-London. 1977.- pp.291 -312.

385. Sandberg L.B., Elastin structure in the heal and disease. / In: Int. Rev. Connect. Tis. Res. // Ed. by D. Hall, D.S.Jackson. – London.-1976.- v.7.- pp. 131-169.

386. Sandberg L.B. Elastin structure in health and diseas. / In: Int. Rev. of connect. tissue res./Ed. by Hall D.A., Jacksoon D.S. // Academic Press.-New York- London. –1976. – v.7.- pp.61-101.

387. Sandberg L.B., Gray W.R., Foster J.A., Torres A.R., Alvares V.L. Primary structure of porcine elastin. /In: Advances in experimental medicine and biology. – v.79. / Elastin and elastic tissue. //Ed. by Sandberg L.B., Gray W.R., Franzblau C. // Plenum Press. New York-London. 1977.- pp.277-284.

388. Sasiskharan V., Bansal M. Self-similarity and assembly of collagen molecules. // Curr. Sci. (India).-1990.-v.59, №17-18.-pp.863-866.

389. Scotchford C.A., Cascone M.G., Downs S., Guisti P. Osteoblast responses to collagen –RVA bioartifical polymers in vitro: the effect of cross-linking method and collagen content. // Biomaterials.-1998.-v.19, №1-3.-pp.1-11.

390. Shirai K., Wada K. Uber die struktur von schweine haut kollagen.// Das Leder.- 1983.- v.34, №12.- pp.197-201.

391. Silbert J.E. Proteoglicans and glycosaminoglicans. /In: Biochemistry and physiology of the skin. Part III. Dermal macromolecules and their metabolism. / Ed. by Goldsmith L.A. // Oxford Univ. Press.- 1983. – v.1.- pp. 448-461.

392. Simpozium on fibrous proteins. / Ed. by Crewther W.C.// New –York.-Plenum Press.-1968.- 432 p.

393. Simulated hair. Пат. 5521228 США. МКИ^6 C08F 2/46. /Weber M.R., Weber P.J. -№373497. Заявл. 17.01.95. Опубл. 28.05.96.

394. Skerrow D. The structure of prekeratin. // Biochim. Biophys.Res. Comm.-1974.- v.59.-pp.1311-1316.

395. Standberg L.B., Blacher R.W., Leach Ch. T., Smith D.W., Rucker R.B. Elastin structure as determined by solid phase liquid and gas microsequencing. / In: Elastin and elastases. // Ed. Robert L., Hornebeek W.- CRC Press. – 1989. – v.1.-pp.175-186.

396. Steinert P.M., Cantieri J.S. Epidermal keratins . . /In: Biochemistry and physiology of the skin. Part III. Dermal macromolecules and their metabolism. / Ed. by Goldsmith L.A.// Oxford Univ. Press.- 1983. – v.1.- pp. 135-169.

397. Sun Shan, Kou Tonghin, Zhu Hesun A study of bioelectret collagen.// J. Appl. Polym. Sci.-1997. V.64, №2.-pp.267-271.

398. Sustained-release preparation. Pat. 4855134 USA. МКИ^4 A 61Л 45/02. / Yamahira Y et al. - № 855387. Заявл. 24.04.86. Опубл. 08.08.89. Приор. 14.10.83. №58-193064.(Япония).

399. Suzuki E., Crewther W.G., Fraser R.D.B., MacRae T.P., McKern. X-ray diffraction and infrared studies of an α-helical fragment from α-keratin. // J. Mol. Biol.- 1973.-v.73.-pp.275-278.

400. Swart L.S., Joubert F.J., Parris D. Homology in the amino acid sequences of

the high –sulfur proteins from keratins. // Proc. Fifth Int. Wool Test. Res. Conf. - Aachen.- 1976. – v. 2.- pp. 254-263.

401. Sykes B., Hawker S. Some investigations in elastin biosynthesis. /In: Advances in experimental medicine and biology. – v.79. / Elastin and elastic tissue. //Ed. by Sandberg L.B., Gray W.R., Franzblau C. // Plenum Press. New York-London. 1977.- pp.453-460.

402. Tanzer M.L. Cross-linking of collagen. / In: Biochemistry of collagen. //Ed. by Ramachandran G., Reddi A.- New York – London, Plenum Press.-1976. –pp.137-162.

403. Timar J., Diczhasi C., Ladanai A., Raso E. Interaction of tumor cells with elastin and the metastatic phenotype. //Ciba Found Symp.- 1995- v.192.- 321-335.

404. Timpl R. Immunological studies on collagen. / In: Biochemistry of collagen. //Ed. by Ramachandran G., Reddi A.- New York – London, Plenum Press.-1976. – pp.319-364.

405. Trnavsky K. Farmakologie kolagenu. //Casopis Iekaru ceskych.-1981.-r.120, №8.-s.209-211.

406. Untersuchungen modifizierter kollagenfilme auf ihre eignung als temporare wundabdeckung. //Leder.-1997.-v.48, №2.-pp.35.

407. Urry D.W. Physicochemical properties of elastin and constituent peptides. / In: Elastin and elastases. // Ed. Robert L., Hornebeek W.- CRC Press. – 1989. – v.1.- pp.141-174.

408. Urry D.W., Long M.M. On the conformation, coacervation and function of polymeric models of elastin. /In: Advances in experimental medicine and biology. – v.79. / Elastin and elastic tissue. //Ed. by Sandberg L.B., Gray W.R., Franzblau C. // Plenum Press. New York-London. 1977.- pp.685-714.

409. Vaculik J. Die kollagenstructur von rindhant und rind leder bei betrachtung mit hilfe der ruster electronenmikroskopie. // Leder.-1983.-v.18, №3.- pp.132-138.

410. Van Vreesmiik J., Norde W. Interaction between fatty acids and elastin. // 13 the Europ. Chem. Interfacees Conf. Kiev, Sept. 11-16. 1994. Abst.- [Kiev].- 1994.-.4.

411. Verfahren aur Spaltung von Keratinen. Пат. 276965 ГДР, МКИ[4] C12P 21/00 Danew Petko, Klassek Peter at. Karl-Marx-Universitan. Leipzig -№3214883. Заявл. 07.11.88. Опубл. 07.03.90.

412. Verfahren zur herstellung von kollagenschaumen in form end loser bander und verwendung in medizin kosmetic und hygiene. Заявка 3832162 ФРГ. МКИ[5] A 61L 15/32, A 61F 13/20. /Anhauser D.et al. -№ 38321629. Заявл. 22.09.88. Опубл. 12.04.90.

413. Volpin D. Ultrastructure of elastin coacervates. /In: Advances in experimental medicine and biology. – v.79. / Elastin and elastic tissue. //Ed. by Sandberg L.B., Gray W.R., Franzblau C. // Plenum Press. New York-London. 1977.- pp.119-128..

414. Weiss J.B. Enzymatic degradation of collagen. / In: Int. rev.of connect. tissue res./Ed. by Hall D.A., Jacksoon D.S. // Academic Press.-New York- London. – 1976. – v.7.- pp.102-159.

415. Wertz P.W., Downing D.T. Integral lipids of human hair. //Lipids.- 1988.-v.23, № 9.- pp.878-881.

416. Wilk K.E., JamesV.J., Amemiya Y. The intermediate filament structure of human hair.// Biochim. Biophys. Acta.- 1995.-v.1245, №3.-pp.392-396.

417. WHO. The enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). // Bull. Wld. Health Org. –1976.-v.54, №2.-pp.129-139.

418. Woods E.F. Microfibrillar proteins of wool: partial specific volumes and molecular weights in denaturing solvents. // Aust. J. Biol. Sci.- 1979.-v.32.-pp.423.

419. Yeh H., Ornstein-Goldstein N.,Indik Z., Rosenbloom J. Biosynthesis and regulations: structure of bovine and human elastic genes. - / In: Elastin and elastases. // Ed. Robert L., Hornebeek W.- CRC Press. – 1989. – v.1.- pp.67-82.

420. Yoshimizu H., Mimura H., Ando I. ^{13}C CR/MAS NMR study of the conformation of stretched or heated low-sulfur keratin-protein films. // Macromolecules.- 1991-v.24, №4.- p.p.862-866.

421. Yu J., Yu D.W., Checkla D.M., Freedberg I.M. Human hair keratins. // Invest. Dermatol.-1993.-v.101, №1.- pp.-565-595.

422. Zahn Y., Wortmann F.-J. Kollagen als hydroplastishes polyampholytmaterial. //Leder. -1997.-v.48, №5.-pp.110-116.

ПРИЛОЖЕНИЯ

ИЗОБРЕТЕНИЯ
и
РАЦИОНАЛИЗАТОРСКИЕ ПРЕДЛОЖЕНИЯ

Приложение 1

СОЮЗ СОВЕТСКИХ СОЦИАЛИСТИЧЕСКИХ РЕСПУБЛИК

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ КОМИТЕТ СССР
ПО ДЕЛАМ ИЗОБРЕТЕНИЙ И ОТКРЫТИЙ

АВТОРСКОЕ СВИДЕТЕЛЬСТВО

№ 1124230

На основании полномочий, предоставленных Правительством СССР, Государственный комитет СССР по делам изобретений и открытий выдал настоящее авторское свидетельство на изобретение:

"Способ выделения фибронектина"

Автор (авторы): Ермолин Геннадий Андреевич, Котелянский Виктор Элизарович, Ефремов Евгений Евгеньевич, Сапожникова Алла Ионовна, Курманова Людмила Вениаминовна, Литвинов Рустам Игоревич и Мухутдинова Рэни Газизовна

Заявитель: ВСЕСОЮЗНЫЙ КАРДИОЛОГИЧЕСКИЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР АМН СССР

Заявка № 3567898 Приоритет изобретения 29декабря 1982г.

Зарегистрировано в Государственном реестре изобретений СССР

15 июля 1984г.

Действие авторского свидетельства распространяется на всю территорию Союза ССР.

Председатель Комитета

Начальник отдела

МПФ Гознака. 1979. Зак. 79-3083.

Приложение 2

СОЮЗ СОВЕТСКИХ СОЦИАЛИСТИЧЕСКИХ РЕСПУБЛИК

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ КОМИТЕТ СССР
ПО ДЕЛАМ ИЗОБРЕТЕНИЙ И ОТКРЫТИЙ

АВТОРСКОЕ СВИДЕТЕЛЬСТВО

№ 1254599

На основании полномочий, предоставленных Правительством СССР, Государственный комитет СССР по делам изобретений и открытий выдал настоящее авторское свидетельство на изобретение:

"Лекарственный состав "аминакол"

Автор (авторы): Каспарьянц Сергей Александрович, Ипполитова Татьяна Владимировна, Месропова Нина Васильевна, Финник Владимир Петрович и Сапожникова Алла Ионовна

Заявитель: МОСКОВСКАЯ ОРДЕНА ТРУДОВОГО КРАСНОГО ЗНАМЕНИ ВЕТЕРИНАРНАЯ АКАДЕМИЯ ИМ.К.И.СКРЯБИНА

Заявка № 3328569 Приоритет изобретения 26 мая 1981г.

Зарегистрировано в Государственном реестре изобретений СССР

1 мая 1986г.

Действие авторского свидетельства распространяется на всю территорию Союза ССР.

Председатель Комитета

Начальник отдела

МПФ Гознака. 1979. Зак. 79-3083.

Приложение 3

СОЮЗ СОВЕТСКИХ СОЦИАЛИСТИЧЕСКИХ РЕСПУБЛИК

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ КОМИТЕТ ПО ИЗОБРЕТЕНИЯМ И ОТКРЫТИЯМ

ПРИ ГОСУДАРСТВЕННОМ КОМИТЕТЕ СССР ПО НАУКЕ И ТЕХНИКЕ

(ГОСКОМИЗОБРЕТЕНИЙ)

АВТОРСКОЕ СВИДЕТЕЛЬСТВО

№ 1508371

На основании полномочий, предоставленных Правительством СССР, Госкомизобретений выдал настоящее авторское свидетельство на изобретение:

"Лекарственное средство для лечения гепатоза животных "Витакол" и способ его получения"

Автор (авторы): Финник Владимир Петрович, Каспарьянц Сергей Александрович, Веселова Таисия Петровна, Сапожникова Алла Ионовна, Мерзропова Нина Васильевна, Чарыева Елена Павловна, Даугалиева Эмма Хасановна и Рачковская Ирина Владимировна

Заявитель: ВСЕСОЮЗНЫЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ ГЕЛЬМИНТОЛОГИИ ИМ.К.И.СКРЯБИНА И МОСКОВСКАЯ ВЕТЕРИНАРНАЯ АКАДЕМИЯ ИМ.К.И.СКРЯБИНА

Заявка № 4238715 Приоритет изобретения 29 апреля 1987г

Зарегистрировано в Государственном реестре изобретений СССР

15 мая 1989г.

Действие авторского свидетельства распространяется на всю территорию Союза ССР.

Председатель Комитета

Начальник отдела

СОЮЗ СОВЕТСКИХ СОЦИАЛИСТИЧЕСКИХ РЕСПУБЛИК

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ КОМИТЕТ ПО ИЗОБРЕТЕНИЯМ И ОТКРЫТИЯМ

ПРИ ГОСУДАРСТВЕННОМ КОМИТЕТЕ СССР ПО НАУКЕ И ТЕХНИКЕ

(ГОСКОМИЗОБРЕТЕНИЙ)

АВТОРСКОЕ СВИДЕТЕЛЬСТВО

№ 1559702

На основании полномочий, предоставленных Правительством СССР, Госкомизобретений выдал настоящее авторское свидетельство на изобретение:

"Способ культивирования вирусов"

Автор (авторы): Скрин Василий Николаевич, Смоленский Владимир Иванович, Смирнова Лидия Павловна, Демкина Марианна Михайловна, Каспарьянц Сергей Александрович, Сапожникова Алла Ионовна и Дьяконова Елена Борисовна

Заявитель: МОСКОВСКАЯ ВЕТЕРИНАРНАЯ АКАДЕМИЯ ИМ.К.И. СКРЯБИНА

Заявка № 4480652 Приоритет изобретения 7сентября1988г.

Зарегистрировано в Государственном реестре изобретений СССР

22 декабря 1989г.

Действие авторского свидетельства распространяется на всю территорию Союза СССР.

Председатель Комитета Ю. Сосин

Начальник отдела

МПФ Гознака. 1988. Зак. 3083.

СОЮЗ СОВЕТСКИХ СОЦИАЛИСТИЧЕСКИХ РЕСПУБЛИК

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ КОМИТЕТ ПО ИЗОБРЕТЕНИЯМ И ОТКРЫТИЯМ

ПРИ ГОСУДАРСТВЕННОМ КОМИТЕТЕ СССР ПО НАУКЕ И ТЕХНИКЕ

(ГОСКОМИЗОБРЕТЕНИЙ)

АВТОРСКОЕ СВИДЕТЕЛЬСТВО

№ 1622990

На основании полномочий, предоставленных Правительством СССР, Госкомизобретений выдал настоящее авторское свидетельство на изобретение:

"Способ получения коллагенового материала"

Автор (авторы): Сапожникова Алла Ионовна и другие, указанные в описании

Заявитель: МОСКОВСКАЯ ВЕТЕРИНАРНАЯ АКАДЕМИЯ ИМ.К.И. СКРЯБИНА

Заявка № 4400803 Приоритет изобретения 30 марта 1988г.

Зарегистрировано в Государственном реестре изобретений СССР

22 сентября 1990г.

Действие авторского свидетельства распространяется на всю территорию Союза ССР.

Председатель Комитета

Начальник отдела

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ

КОМИТЕТ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ ПО ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

(РОСПАТЕНТ)

П А Т Е Н Т

N 2007451

на ИЗОБРЕТЕНИЕ:

"Способ получения микроносителей для культивирования клеток"

Патентообладатель(ли): Саложникова Алла Ионовна, Акопян Валентин Бабкенович, Каспарьянц Сергей Александрович, Смирнова Лидия Павловна и Дьяконова Елена Борисовна

Страна:

Автор (авторы): они же

Приоритет изобретения 28 декабря 1991г.

Дата поступления заявки в Роспатент 28 декабря 1991г.

Заявка N 5016591

Зарегистрировано в Государственном реестре изобретений 15 февраля 1994г.

ПРЕДСЕДАТЕЛЬ РОСПАТЕНТА

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ

КОМИТЕТ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ ПО ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

(РОСПАТЕНТ)

П А Т Е Н Т

N 2031597

на ИЗОБРЕТЕНИЕ:
"Способ получения коллагенового геля"

Патентообладатель(ли): Каспарьянц Сергей Александрович, Сапожникова Алла Ионовна, Месропова Нина Васильевна, Гордиенко Инна Михайловна, Акопян Валентин Бабкенович и Петров Павел Евгеньевич

Страна:

Автор (авторы): они же

Приоритет изобретения	12 февраля 1992г.
Дата поступления заявки в Роспатент	12 февраля 1992г.
Заявка N 5022810	
Зарегистрировано в Государственном реестре изобретений	27 марта 1995г.

ПРЕДСЕДАТЕЛЬ РОСПАТЕНТА

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ

КОМИТЕТ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ ПО ПАТЕНТАМ
И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ
(РОСПАТЕНТ)

ПАТЕНТ

№ 2059711

на ИЗОБРЕТЕНИЕ

"Способ очистки суспензии спорозоитов эймерий от примесей"

Патентообладатель (ли): Белоостоцкая Галина Борисовна, Хованских Александр Егорович и Сапожникова Алла Ионовна

Автор (авторы): они же

Приоритет изобретения 31 июля 1992г.

Дата поступления заявки в Роспатент 31 июля 1992г.

Заявка № 5050843

Зарегистрирован в Государственном реестре изобретений 10 мая 1996г.

ПРЕДСЕДАТЕЛЬ РОСПАТЕНТА

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ

РОССИЙСКОЕ АГЕНТСТВО ПО ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ (РОСПАТЕНТ)

П А Т Е Н Т

№ 2092071

на ИЗОБРЕТЕНИЕ

"Способ получения эластина"

Патентообладатель (ли): Сапожникова Алла Ионовна, Каспарьянц Сергей Александрович, Месропова Нина Васильевна и Гордиенко Нина Михайловна

Автор (авторы): они же

Приоритет изобретения 6 октября 1995г.

Дата поступления заявки в Роспатент 6 октября 1995г.

Заявка № 95117244

Зарегистрирован в Государственном реестре изобретений 10 октября 1997г.

ГЕНЕРАЛЬНЫЙ ДИРЕКТОР

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ

РОССИЙСКОЕ АГЕНТСТВО ПО ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ (РОСПАТЕНТ)

П А Т Е Н Т

№ 2092072

на ИЗОБРЕТЕНИЕ

"Способ получения кератина"

Патентообладатель (ли): Сапожникова Алла Ионовна, Каспаръянц Сергей Александрович, Месропова Нина Васильевна и Гордиенко Нина Михайловна

Автор (авторы): они же

Приоритет изобретения 6 октября 1995г.

Дата поступления заявки в Роспатент 6 октября 1995г.

Заявка № 95117245

Зарегистрирован в Государственном реестре изобретений 10 октября 1997г.

ГЕНЕРАЛЬНЫЙ ДИРЕКТОР

Приложение 11

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ

РОССИЙСКОЕ АГЕНТСТВО ПО ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

ПАТЕНТ

НА ИЗОБРЕТЕНИЕ

№ 2129805

На основании Патентного закона Российской Федерации, введенного в действие 14 октября 1992 года, Российским агентством по патентам и товарным знакам выдан настоящий патент на изобретение

СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ КОЛЛАЗОЛЯ

Патентообладатель(ли):

Сапожникова Алла Ионовна, Каспарьяну Сергей Александрович, Белевцова Дарья Валерьевна

по заявке № 97121210, дата поступления: 30.12.97

Приоритет от 30.12.97

Автор(ы) изобретения:

Сапожникова Алла Ионовна, Каспарьяну Сергей Александрович, Белевцова Дарья Валерьевна

Патент действует на всей территории Российской Федерации в течение 20 лет с **30 декабря 1997 г.** при условии своевременной уплаты пошлины за поддержание патента в силе

Зарегистрирован в Государственном реестре изобретений Российской Федерации

г. Москва, ***10 мая 1999 г.***

Генеральный директор

А.Д. Корчагин

Приложение 12

УДОСТОВЕРЕНИЕ

на рационализаторское предложение

№II5-28/335-470 17.II.83
(дата подачи)

В соответствии с пунктом 75 Положения об открытиях, изобретениях и рационализаторских предложениях, утвержденного постановлением Совета Министров СССР от 21 августа 1973 г. № 584, настоящее удостоверение выдано Каспарьянцу С.А., Сапожниковой А.И., Ермолину Г.А., Лукьяновскому В.А., Гордиенко И.М.
(фамилия, имя, отчество)

на предложение, признанное рационализаторским и принятое Главным управлением ветеринарии МСХ СССР
(наименование предприятия, организации, когда)

к использованию под наименованием: "Способ обнаружения антител к коллагену"

(М.П.) Руководитель предприятия (организации) Начальник Главветупра МСХ СССР

16 сентября 1984 г.

А.Д.Третьяков

1980—6299

Приложение 13

УДОСТОВЕРЕНИЕ

на рационализаторское предложение

№ 60 09.09.86г.
(дата подачи)

В соответствии с пунктом 75 Положения об открытиях, изобретениях и рационализаторских предложениях, утвержденного постановлением Совета Министров СССР от 21 августа 1973 г. № 584, настоящее удостоверение выдано Сапожниковой А.И., Каспарьянцу С.А., Житенко П.В., Месроповой Н.В., Городенцевой Е.И., Беляковой Н.П.
(фамилия, имя отчество)

на предложение, признанное рационализаторским и принятое Московской ордена Трудового Красного Знамени ветеринарной академией им. К.И.Скрябина
(наименование предприятия, организации, когда)

к использованию

под наименованием: Способ выявления гнилостных процессов в кожевенном сырье

(М. П.) 17 11 1986г.

Руководитель предприятия (организации) Г.Н.Коржевенко

Тип. МВА Зак. 1469—500

ВНЕДРЕНИЕ

в

УЧЕБНЫЙ ПРОЦЕСС

Приложение 14

ВСЕСОЮЗНАЯ АКАДЕМИЯ
СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ НАУК
имени В. И. ЛЕНИНА

СОВЕТ ПО КООРДИНАЦИИ
НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИХ
РАБОТ В ОБЛАСТИ ПОВЫШЕНИЯ
КАЧЕСТВА ПРОДУКТОВ ЖИВОТНОВОДСТВА

МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ по определению показателей качества кожевенного и шубно-мехового сырья

Москва 1986

Рекомендации составлены: С.А.Каспарьянцем, К.Д.Хлудеевым, Б.И.Кирилюком, А.И.Сапожниковой, И.М.Гордиенко, Н.В.Месроповой, Л.И.Устименко (МВА); А.А.Сакулиной, А.Н.Гавриилиной, А.Н.Михайловым, Б.С.Шименовичем (ЦНИИКП); Ю.В.Игнатовым, Г.Г.Лосевым, Г.С.Григорьевой, А.М.Зубиным, Э.И.Степановой, Л.Г.Плюсниной, Н.К.Черновой (ВНИИМехПром); Л.И.Лаптевой, Д.П.Радкевичем, Д.Б.Изюмовым, Т.В.Малофеевой, С.И.Пушкаревой (ВНИИМясПром); Л.Д.Семакиным (ВНИИОЗ); Н.М.Пасечником (ВИЖ); Ш.К.Ганцовым, Т.Н.Вудник (Заочный институт советской торговли); В.Б.Игнатенко (МИНХ); В.В.Нестером (ВАСХНИЛ).

Рекомендации рассмотрены и утверждены Комиссией по качеству животного сырья Совета по координации научно-исследовательских работ в области повышения качества продуктов животноводства при Президиуме ВАСХНИЛ (протокол № 18 от 19.12.84).

Ответственный за выпуск - ученый секретарь Совета кандидат с.-х. наук В.В.Нестер.

© Всесоюзная академия сельскохозяйственных наук имени В.И.Ленина

Приложение 15

МИНИСТЕРСТВО СЕЛЬСКОГО ХОЗЯЙСТВА СССР
МОСКОВСКАЯ ОРДЕНА ТРУДОВОГО КРАСНОГО ЗНАМЕНИ
ВЕТЕРИНАРНАЯ АКАДЕМИЯ имени К. И. СКРЯБИНА

С. А. КАСПАРЬЯНЦ, А. И. САПОЖНИКОВА,
И. М. ГОРДИЕНКО

ОПРЕДЕЛЕНИЕ УГЛЕВОДНЫХ КОМПОНЕНТОВ (ГЕКСОЗ И ГЕКСОЗАМИНОВ) В ОБРАЗЦАХ КОЖЕВЕННОГО СЫРЬЯ, ПОЛУФАБРИКАТА, ГОТОВОЙ КОЖИ И МОДИФИЦИРОВАННЫХ КОЛЛАГЕНСОДЕРЖАЩИХ МАТЕРИАЛАХ

Утверждено учебно-методическим советом факультета товароведения животного сырья в качестве методических указаний

Москва — 1984

Приложение 16

МИНИСТЕРСТВО СЕЛЬСКОГО ХОЗЯЙСТВА СССР
МОСКОВСКАЯ ОРДЕНА ТРУДОВОГО КРАСНОГО ЗНАМЕНИ
ВЕТЕРИНАРНАЯ АКАДЕМИЯ имени К. И. СКРЯБИНА

С. А. КАСПАРЬЯНЦ, А. И. САПОЖНИКОВА,
И. М. ГОРДИЕНКО, Н. В. МЕСРОПОВА

ПОЛУЧЕНИЕ РАСТВОРОВ КОЛЛАГЕНА I ТИПА

Утверждено учебно-методическим советом факультета товароведения животного сырья в качестве методических указаний

Москва — 1985

Приложение 17

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ АГРОПРОМЫШЛЕННЫЙ
КОМИТЕТ СССР
МОСКОВСКАЯ ОРДЕНА ТРУДОВОГО КРАСНОГО ЗНАМЕНИ
ВЕТЕРИНАРНАЯ АКАДЕМИЯ имени К. И. СКРЯБИНА

С. А. Каспарьянц, П. В. Житенко, Н. В. Месропова,
А. И. Сапожникова, Е. И. Городенцева, Н. П. Белякова

СПОСОБ ОПРЕДЕЛЕНИЯ БАКТЕРИАЛЬНОЙ ОБСЕМЕНЕННОСТИ СЫРЬЯ ЖИВОТНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ

Москва 1987

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ

в

НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОЙ РАБОТЕ

Приложение 18

МИНИСТЕРСТВО МЕДИЦИНСКОЙ ПРОМЫШЛЕННОСТИ
ВСЕСОЮЗНОЕ ПРОМЫШЛЕННОЕ ОБЪЕДИНЕНИЕ ПО ПРОИЗВОДСТВУ АНТИБИОТИКОВ, КРОВЕЗАМЕНИТЕЛЕЙ И ОРГАНОПРЕПАРАТОВ (объединение «СОЮЗАНТИБИОТИКИ»)
ВСЕСОЮЗНЫЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ ТЕХНОЛОГИИ КРОВЕЗАМЕНИТЕЛЕЙ И ГОРМОНАЛЬНЫХ ПРЕПАРАТОВ (ВНИИТКГП)
109044, г. Москва, Ж-44, Лавров пер., 6, тел. 271-26-05. Р. С. 367602 в Пролетарском отд. Госбанка г. Москвы

от 61-939 № 6.II.85
на № 1916 от 18.11.85 г.

Проректору по НИР МВА им.К.И. Скрябина

профессору Коржевенко Г.Н.

Об использовании методик

В лаборатории кетгута и животного сырья при проведении научно-исследовательских работ по теме: "Разработка технологии изготовления кетгута из серозной оболочки черев к.р.с." были апробированы методики "Определения углеводных компонентов (гексоз и гексозаминов) в образцах кожевенного сырья, полуфабриката, готовой кожи и модифицированных коллагенсодержащих материалов" и "Определение содержания амино- и карбоксильных групп в коллагенсодержащих материалах", разработанные на кафедре товароведения и технологии животного сырья МВА.

Выявленная зависимость между увеличением числа свободных амино- и карбоксильных групп и порчей автолизного и гнилостного сырья была использована при разработке метода оценки качества кишечного сырья, поступающего на Казанский завод шовных хирургических материалов. Методика определения углеводных компонентов применяется в настоящее время для исследования изменений химического состава соединительной ткани кишок в процессе получения кетгута и оценки качества готового шовного материала.

Зам.директора института по научной работе, доктор мед.наук Г.Т.Черненко

Исп.Бондарева Л.Н.
тел.271-27-25

Приложение 19

АКТ ОБ ИСПОЛЬЗОВАНИИ РАЦИОНАЛИЗАТОРСКОГО ПРЕДЛОЖЕНИЯ

"9" октября 1984 г.

Регистрационный номер или номер авторского свидетельства и заявки (рац.предложения) № 115-28/335-470 от 17.11.83 (Главветупр МСХСС

Фамилия, имя, отчество автора Каспарьянц С.А., Сапожникова А.И., Ермолин Г.А. Лукьяновский В.А., Гордиенко И.М.

Краткое содержание предложения Предложен способ обнаружения антител к коллаге на основе реакции энзим-меченых антител

После проведенного испытания рац.предложение (или содержание авторского свидетельства) признано годным к использованию в иссдедованиях в Московской ветеринарной академии

(указать, где именно)

и с "12" сентября 1984 г. использовано на кафедре товарове-дения и технологии животного сырья для оценки степени антигенности и иммуногенности коллагенсодержащих материалов, применяемых в ветеринарной практике (задание 7, этап 7.01

Ответственность за дальнейшее использование предложения возлагается на тов. А.И.Сапожникову, который обязан в случае прекращения использования предложения поставить в известность отдел, бюро или уполномоченного по изобретательству и рационализации в течение 5 дней.

Зав.лабораторией (кафедрой) К.Д.Хлудеев

Научный руководитель С.А.Каспарьянц

Ст.научный сотрудник патентного отдела академии П.С.Мурый

Проректор по НИР МВА профессор Г.Н.Коржевенко

Приложение 20

АКТ ОБ ИСПОЛЬЗОВАНИИ РАЦИОНАЛИЗАТОРСКОГО ПРЕДЛОЖЕНИЯ

"30" января 1985 г.

Регистрационный номер или номер авторского свидетельства и заявки (рац.предложения) № 115-28/335-470 от 17.II.83 (Главветупр МСХ СССР)

Фамилия, имя, отчество автора Ермолин Г.А., Каспарьянц С.А., Сапожникова А.И Лукьяновский В.А., Гордиенко И.М.

Краткое содержание предложения Предложен способ обнаружения антител к коллагену на основе реакции энзим-меченых антител

После проведенного испытания рац.предложение (или содержание авторского свидетельства) признано годным к использованию в исследованиях в качестве лабораторно-диагностического теста, позволяющего по уровню аутоантител к коллагену в биологических жидкостях организма человека выявлять различные формы патологии соединительной ткани.

и с "8" октября 1984 г. использовано в лаборатории иммунохимии ИЭК ВКНЦ (на кафедре, лаборатории и т.п.учреждениях)

Ответственность за дальнейшее использование предложения возлагается на тов. Ермолина Г.А., который обязан в случае прекращения использования предложения поставить в известность отдел, бюро или уполномоченного по изобретательству и рационализации в течение 5 дней.

Зав.лабораторией, канд.биол.наук Г.А.Ермолин

Научный руководитель, канд.хим.наук М.М.Диков

Руководитель патентного отдела Н.И.Савельева

Зам.директора НИИЭК ВКНЦ АМН СССР Л.К.Топильский

Приложение 21

АКАДЕМИЯ НАУК СССР

ИНСТИТУТ ЭВОЛЮЦИОННОЙ ФИЗИОЛОГИИ и БИОХИМИИ им. И. М. СЕЧЕНОВА

194223 Ленинград, пр. М. Тореза, 44
Телефон: 552-79-01,
Расчетный счет № 13089110309
в Выборгском отд. Госбанка

22/10.91 № 3/888

На №

Ректору МВА им. К.И.Скрябина

академику ВАСХНИЛ А.Д.Белову

109472 Москва, ул.академика Скрябина, 23

Заключение
об опробации микроносителей на основе коллагена, разработанных в лаборатории товароведения и технологии животного сырья МВА им. К.И.Скрябина

В лаборатории функциональной биохимии беспозвоночных ИЭФиБ им. И.М.Сеченова АН СССР были опробованы коллагеновые микроносители разного диаметра, разработанные Сапожниковой А.И., Каспарьянцем и др., для очистки суспензии спорозоитов паразитических простейших от посторонних примесей. Было показано, что можно добиться высокой степени очистки (более 95%) при фильтрации суспензии спорозоитов эймерий через колонку с микроносителями размером около 200 мкм.

Учитывая положительные результаты, Институт планирует закупать у Вас коллагеновые микроносители данного размера для научно-исследовательских целей. Ориентировочная потребность в 1992 г. - 400 г. В дальнейшем потребность может возрасти.

Зам. директора Института
д.б.н. А.И.Кривченко

РПМ ВАН. з. 41, т. 20000. 24-1-88 г.

Приложение 22

НАУЧНО-УЧЕБНЫЙ ЦЕНТР
ПРОБЛЕМ ЖИЗНЕДЕЯТЕЛЬНОСТИ ЧЕЛОВЕКА
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК
9842 Москва телефон (095)-203-93-89
ул. Волхонка, 14 факс (095)-238-85-66

RESEARCH CENTER OF PROBLEMS
OF VITAL HUMAN ACTIVITY
RUSSIAN ACADEMY OF SCIENCES
119842 Moscow phone (095)-203-93-89
Volkhonka str., 14 fax (095)-238-85-66

З А К Л Ю Ч Е Н И Е

В 1992-93гг в Научном Центре проблем жизнедеятельности человека РАН проведена апробация коллагеновых пленок, содержащих биостимулирующую аутосыворотку крови человека обладающую миогенным и сомногенным действием.

Способ получения сыворотки разработан и запатентован д.м.н, проф. В.А.Шестаковым с соавторами.

Рецептура композиционной смеси, содержащей коллаген в качестве матрицы, действующее начало (сыворотки) и ряд других добавок, оптимальное соотношение компонентов, условия иммобилизации сывороток на коллагеновом носителе и способ получения пленок разработан ведущим научным сотрудником лаборатории товароведения и технологии животного сырья Московской государственной академии ветеринарной медицины и биотехнологии им. академика К.И.Скрябина к.б.н. А.И.Сапожниковой.

Испытания проведены на спортсменах-боксерах, из которых сформировано 6 групп по 6 человек в каждой.

В экспериментальные группы ЭГ-I и ЭГ-2 включены спортсмены, которые получали сомногенную сыворотку в виде инъекций и сублингвально в виде пленок соответственно, а в группы ЭГ-3 и ЭГ-4 - миогенную сыворотку аналогично.

В контрольных группах КГ-5 и КГ-6 спортсмены никаких препаратов не получали.

Все экспериментальные и контрольные группы обследовались по одной и той же методике: исходные данные, через 30 мин. после приема препаратов, на I-й день, на 3-й день. Испытуемых тестировали по таким показателям как велсэргометрия, психофизиологические показатели.

В ходе проведенных испытаний установлено, что коллагеновые пленки содержащие биостимулирующие мотивационные аутосыворотки, представляют собой более удобную в применении лекарственную форму, позволяют пролонгировать физиологический эффект препаратов, дают возможность увеличить стабильность в процессе хранения, уменьшить дозу и частоту

введения препарата, препятствовать их быстрой инактивации,

Считаем целесообразным рекомендовать коллагеновые пленки с мотивационными аутосыворотками для более широкой спортивно-практической апробации и несомненно продолжить работы в данном направлении.

Генеральный директор
Центра, профессор (Шестаков В.А.)

Приложение 23

"УТВЕРЖДАЮ"

А.И.Колесов

Зам.председателя

Госкомспорта СССР

А К Т

внедрения научных результатов

"15" августа 1990 г.

Мы, нижеподписавшиеся, сотрудники научно-учебного центра комплексных проблем жизнедеятельности человека АН СССР и Гособразования СССР и главный тренер сборной команды СССР по боксу Копцев Константин Николаевич составили настоящий акт в том, что в практику подготовки спортсменов сборной команды СССР по боксу внедрены сдедующие рекомендации и предложения

Ф.И.О.	Наименование предложения	Эффект от внедрения
Шестаков В.А., Богомолов А.Н. Тестов Ю.Б. Сапожникова А.И.	Методика применения сыворотки, обладающей сомногенными свойствами, в виде сублингвальной пленки	Нормализация биоритма "сон-бодрствование"

Представители разработчиков — Шестаков В.А.

Богомолов А.Н.

Тестов Ю.Б.

Сапожникова А.И.

Представители организации, где внедряется предложение

Главный тренер — Копцев К.Н.

Руководитель КНГ — Циргиладзе И.В.

Врач команды — Николаев В.А.

ТЕХНИЧЕСКИЕ УСЛОВИЯ

и

НАСТАВЛЕНИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

Приложение 24

УДК
Группа
Регистр.№

УТВЕРЖДАЮ
Начальник Главного
управления ветеринарии
_____ В.И.Касюк
13 ноября 1991г

АМИНАКОЛ
для ветеринарии

Технические условия
(на опытную партию 3т.)
ТУ 10.07.210 - 91

Срок введения с 01.01.92
по 01.01.94

СОГЛАСОВАНО
Директор ВГНКИ
ветпрепаратов
_____ А.Н.Панин
13 ноября 1991г

РАЗРАБОТАНО
Проректор по НИР Московской
ветеринарной академии имени
К.И.Скрябина
академик РАСХН _____ В.П.Шишков
1991г

Настоящие технические условия распространяются на лекарственный состав АМИНАКОЛ, представляющий собой комплексное соединение аминазина с коллагеном, обладающее пролонгированным стресспротективным действием,и предназначенный для применения при проведении различных зоо-ветеринарных мероприятий.

1. ТЕХНИЧЕСКИЕ ТРЕБОВАНИЯ

1.1. АМИНАКОЛ должен соответствовать требованиям настоящих технических условий и изготавливаться по технологическому регламенту,утвержденному в установленном порядке.

1.2. Для производства АМИНАКОЛА используют следующие виды сырья:
аминазин по ГФХ с.48,
кислота аскорбиновая по ТУ 64-5-143-87,
коллаген по ТУ 64-19-103-91,
вода дистилированная по ГОСТ 6709-72.

1.3. По показателям качества АМИНАКОЛ должен соответствовать требованиям, указанным в таблице

Наименование показателя	Характеристика и норма	Метод испытания
1. Внешний вид,цвет,запах	Жидкость непрозрачная, бесцветная или со слегка желтоватым оттенком,вязкая,без характерного запаха	по ГФ X1,вып.1,с. 194 и органолептически
2. Водородный показатель /pH/	4,0-4,5	по ГФ X1,вып.1,с. 114
3. Подлинность	Положительные реакции на аминазин,аскорбиновую кислоту, коллаген	по п.4.4. наст.ТУ
4. Массовая доля аминазина, % от сухого вещества	41,2-42,0	по п.4.5. наст.ТУ
5. Массовая доля аскорбиновой кислоты, % от сухого вещества	49,0-51,0	по п.4.6. наст.ТУ
6. Массовая доля коллагена, % от сухого вещества	8,1-8,8	по п.4.7. наст.ТУ
7. Безвредность	безвреден	по п.4.8. наст.ТУ
8. Стерильность	стерилен	по ГОСТ 28085-89

Приложение 25

УТВЕРЖДАЮ
Начальник Главного управления ветеринарии
В.И.Касюк
..... 1991г

107139, Москва, Орликов пер. 1/П

ВРЕМЕННОЕ НАСТАВЛЕНИЕ
по применению аминакола в ветеринарии

1. ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ

1.1. Аминакол - комплексный препарат, в состав которого входят аминазин, аскорбиновая кислота и коллаген.

1.2. Аминакол представляет собой тягучую, вязкую, непрозрачную, бесцветную или со слегка желтоватым оттенком жидкость.

1.3. Препарат выпускают расфасованным по 100 или 200 мл в стеклянные флаконы из темного стекла, герметично закрытые резиновыми пробками и алюминиевыми колпачками. Хранят с предосторожностью / список Б / в сухом, защищенном от света месте при температуре 4-8°С. Срок годности при указанных условиях хранения - 2 года со дня изготовления.

2. ФАРМАКОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА

2.1. Аминакол обладает выраженным стресс-протективным действием. Он предупреждает возникновение нежелательных изменений в морфологическом и биохимическом составе крови, уменьшает потери массы телят при перевозке, способствует быстрой адаптации животных к новым условиям содержания и кормления. Оказывает благоприятное действие на обмен веществ

усиливает анаболические процессы, уменьшает двигательную активность, вызывает состояние пониженной реактивности к воздействию различных раздражителей, повышает продуктивность животных.

3. ПОРЯДОК ПРИМЕНЕНИЯ

3.1. Аминакол предназначен для профилактики транспортного стресса и снятия технологического стресса у молодняка при адаптации животных к новым условиям содержания и кормления, при комплектации молодняка на доращивание и откорм, а также при проведении кастрации, биркований, каудотомии и других зоотехнических и ветеринарных мероприятий.

3.2. Профилактику стресса у молодняка осуществляют путем однократной внутримышечной инъекции аминакола в дозе по 0,05–0,1 мл/кг массы перед стресс-воздействием, отбором к взвешиванию и перевозке, биркованием, кастрацией и др.

3.3. Профилактику адаптационного стресса осуществляют в комплексе по доращиванию и откорму молодняка, путем внутримышечного однократного введения аминакола в дозе 0,05–0,1 мл/кг массы.

3.4. Применение аминакола не вызывает осложнений и не оказывает побочного действия. Противопоказаний по применению препарата не имеется.

Временное наставление разработано Московской ветеринарной академией. Одобрено Госветфармкомиссией 26 марта 1991г /протокол №2/.

Приложение 26

МИНИСТЕРСТВО СЕЛЬСКОГО ХОЗЯЙСТВА И ПРОДОВОЛЬСТВИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

УДК
Группа
Регистр.№

Зам. начальника
Департамента ветеринарии
Минсельхозпрода РФ
_____ В.В.Селиверстов
_____ 1996 г.

РАЗРАБОТАНО
Проректор Московской Государственной академии ветеринарной медицины и биотехнологии им. К.И.Скрябина,
академик РАСХН, профессор
_____ В.П.Шишков
"14" августа 1996г

В И Т А К О Л

ТЕХНИЧЕСКИЕ УСЛОВИЯ

(на опытную партию т)

Срок введения с
до

СОГЛАСОВАНО
Директор ВНИИ ветпрепаратов
_____ Д.Н.Панин
"19" августа 1996 г.

15.08.96.

199 г.

Настоящие технические условия распространяются на препарат Витакол представляющий многокомпонентнй состав, включающий комплекс водорастворимых витаминов, стабилизированным коллагеном.

Препарат предназначен для предотвращения нарушения обмена веществ, повышения естественной резистентности и иммунобиологической реактивности, снижения репродуктивной способности животных и питательной ценности продуктов животноводства, витаминизации маточного поголовья и молодняка. Настоящие технические условия могут быть использованы с целью сертификации данной продукции.

1. ТЕХНИЧЕСКИЕ ТРЕБОВАНИЯ

1.1. Витакол должен соответствовать требованиям настоящих технических условий и изготавливаться по техническому регламенту, утвержденному в установленном порядке.

1.2. Для производства Витакола используют следующие виды сырья:
кислота аскорбиновая по ТУ 64-5-143-87
тиамин по ГФ X, ст.674
рибофлавин по ГФ X, ст.585
никотинамид по ГФ X, ст.45
пиридоксин по ГФ X, ст.666
коллаген по ТУ 64-19-103-91
вода дистиллированная по ГОСТ 6709-72

1.3. По показателям качества Витакол должен соответствовать требованиям, указанным в таблице 1.

Таблица 1

Наименование	Характеристика и норма		Метод испытания
	жидкая форма	сухая форма	
№ 1	2	3	4
1. Внешний вид, цвет, запах	Жидкость непрозрачная желтого цвета, с характерным для витаминов запахом, вязкая	Порошок желтого цвета с характерным для витаминов запахом	по п.4.2.наст.ТУ
2. Водородный показатель /pH/	4,0 - 5,0		по п.4.4.наст.ТУ
3. Подлинность	Положительная	Положительная	по п.4,5.наст.ТУ
4. Массовая доля сухого вещества,%	4,7 - 4,9		по п.4.6.наст.ТУ
5. Массовая доля воды,%		14,0 - 15,0	по п.4,6.наст.ТУ
6. Массовая доля аскорбиновой кислоты,% от сухого вещества	43,6 - 45,6	43,6 - 45,6	по п.4.7.наст.ТУ
7. Массовая доля тиамина,% от сухого вещества	10,2 - 11,2	10,2 - 11,2	по п.4.8.наст.ТУ

Приложение 27

**МИНИСТЕРСТВО
СЕЛЬСКОГО ХОЗЯЙСТВА
И ПРОДОВОЛЬСТВИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
(Минсельхозпрод России)**

ДЕПАРТАМЕНТ ВЕТЕРИНАРИИ

**107139, Москва, Орликов пер., 1/11
Для телеграмм: Москва, 84
Минпросельхозпрод.
Телетайп: 417738 ЛЕН
Телефон:**

15.II.96г. № 13-5-2/782

на №_____ от _____

УТВЕРЖДАЮ
Заместитель начальника
Департамента ветеринарии

_____ В.В.Селиверстов
10 ноября 1996 г.

ВРЕМЕННОЕ НАСТАВЛЕНИЕ

по применению препарата витакол в ветеринарии (в порядке широкого производственного испытания до 01.01.1999 г.)

1. ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ

1.1. ВИТАКОЛ - многокомпонентный препарат, в состав которого входит комплекс водорастворимых витаминов (тиамин, рибофлавин, никотинамид, пиридоксин, аскорбиновая кислота), стабилизированных коллагеном.

1.2. Препарат выпускают в жидкой и сухой формах. Жидкая форма препарата представляет собой вязкую непрозрачную жидкость желтого цвета с характерным для витаминов запахом. Сухая форма - порошок желтого цвета с характерным для витаминов запахом, растворим в воде.

1.3. Препарат расфасовывают по 100, 200 и 500 мл во флаконы из темного дрота или стекломассы (жидкая форма) или по 10 кг в пакеты из полиэтиленовой пленки (порошок).

1.4. ВИТАКОЛ хранят в сухом, защищенном от света месте при температуре от 0 до 10 С . Срок годности препарата - 1 год со дня изготовления.

2. БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА

2.1. ВИТАКОЛ обладает широким спектром действия, проявляет активность как тканевой и как витаминный препарат. ВИТАКОЛ активизирует обменные и репаративные процессы, повышает неспецифическую реактивность организма, улучшает показатели крови, оказывает общетонизирующее действие, ускоряет процесс адаптации молодняка сельскохозяйственных животных к влиянию вредных факторов внешней среды, стимулирует рост и развитие животных.

3. ПРИМЕНЕНИЕ

3.1. ВИТАКОЛ применяют с целью повышения естественной резистентности и иммунобиологической реактивности животных.

3.2. ВИТАКОЛ в жидкой форме назначают: телятам - 0,1 - 0,15 мл на 1 кг массы; поросятам - 1 мл на 1 животное двукратно с интервалом 7-10 дней; коровам и свиньям по 0,03 - 0,05 мл на 1 кг массы .двукратно с интервалом 10 -14 дней. Цыплятам препарат (в сухой форме) назначают с кормом (комбикормом, стартовым кормом) из расчета 0.05 г порошка на 1 кг массы ежедневно в течение 7 дней.

3.3. ВИТАКОЛ в рекомендуемых дозах побочных явлений и осложнений не вызывает. Противопоказаний для применения не установлено.

Временное наставление разработано Московской государственной академией ветеринарной медицины и биотехнологии им. К.И.Скрябина.

Одобрено Фармакологическим советом (прот.№I от I7.0I.95)

Регистрационный номер препарата 000413-ОП

Лошкова

17.10.96.

Приложение 28

СОГЛАСОВАНО

Главный санитарный врач
Минздрава РСФСР
№ 05 РС - 1577 Подунова Л.Г.
"05" 06 1991 г.

УДК
Группа
Регистр. №

УТВЕРЖДАЮ

Директор по подготовке и организации производства концерна "Союзпарфюмерпром"
Воскресенская Л.В.
"26" июня 1991 г.

КОЛЛАГЕН ПК

Технические условия

ТУ 64-19-103-91

(на опытную партию 5 т)

Срок введения с

СОГЛАСОВАНО

Зам.директора ВНИИСПДВ
по научной части косметической отрасли
Войнеховская А.Л.
"29" 05 1991 г.

РАЗРАБОТАНО

Ректор Московской ветеринарной академии им. К.И.Скрябина
Белов А.Д.
"[illegible]" июня 1991 г.

СОГЛАСОВАНО

Главный инженер Кишиневской парфюмерно-косметической фабрики "Виорика"
Романюк В.Г.
"12" 06 1991 г.

1991

Настоящие технические условия распространяются на коллаген, получаемый из отходов животного сырья, представляющий собой 1%-ный раствор в 0,25 моль/дм^3 уксусной кислоте, и предназначенный для применения в парфюмерно-косметической промышленности.

I. ТЕХНИЧЕСКИЕ ТРЕБОВАНИЯ

I.I. Коллаген должен соответствовать требованиям настоящих технических условий и изготавливаться по техническому регламенту, утвержденному в установленном порядке.

I.2. Для производства коллагена применяются следующие виды сырья:
гольевой спилок шкур крупного рогатого скота по ТУ I7-06-I6-77
натрия гидроксид, х.ч. по ГОСТ 4328-77
натрия сульфат безводный, х.ч. по ГОСТ 6053-77
кислота соляная, х.ч. по ГОСТ 3II8-77
кислота укоусная, х.ч. по ГОСТ 6I-75
параформальдегид технический марки А по ТУ 6-05-930-78
формалин технический I-П сорт по ГОСТ I625-75

I.3. По органолептическим, физико-химическим и биологическим показателям коллаген должен соответствовать требованиям, указанным в таблице

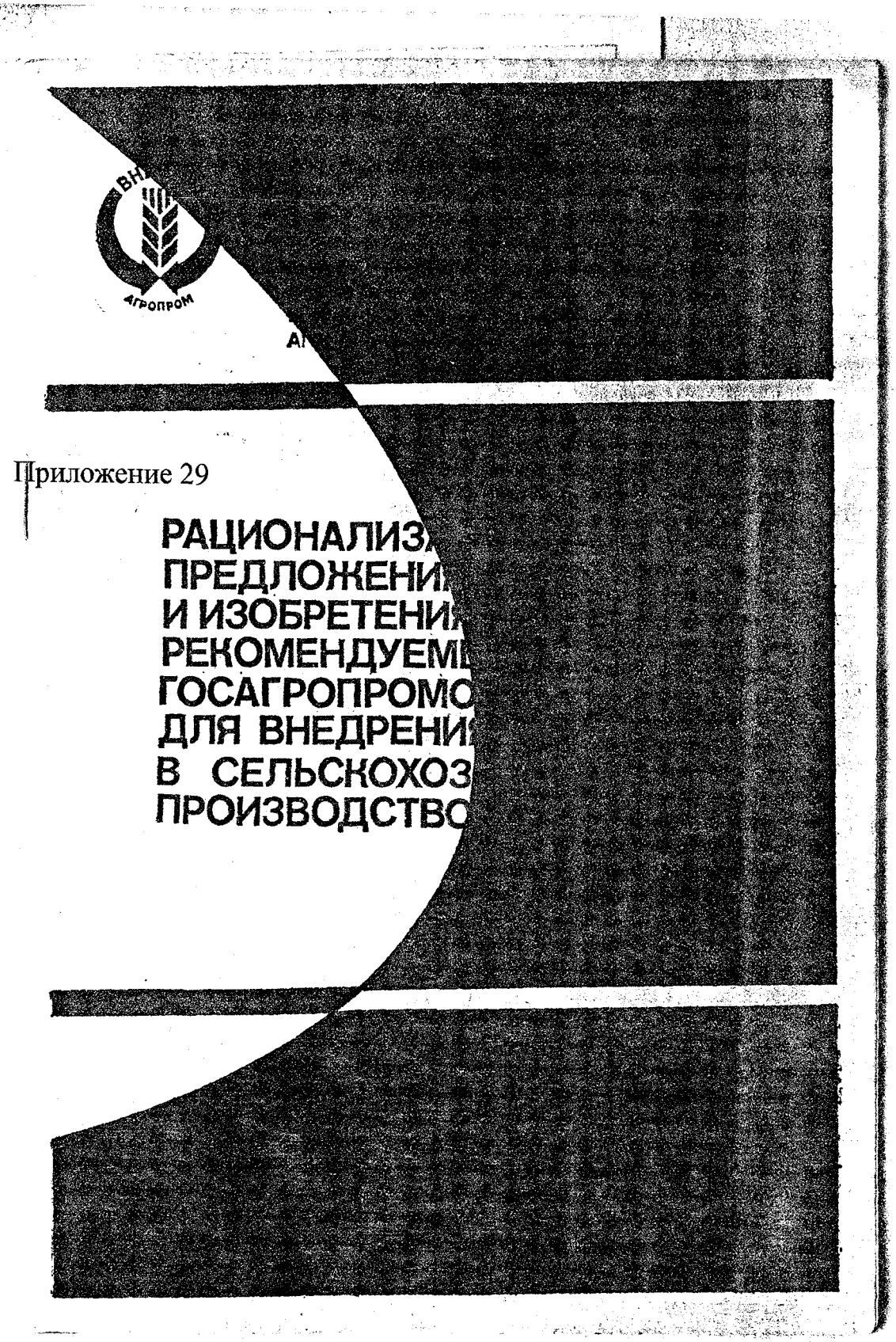
Наименование показателя	Характеристика и норма	Метод испытания
I	2	3
I. Внешний вид, цвет	Жидкость бесцветная слегка опалесцирующая, вязкая	по ГФ XI, вып. I с. I94
2. Водородный показатель (pH)	3,5 – 4,5	по ГФ XI, вып. I с. II4
3. Подлинность	Положительная реакция на коллаген	по п. 3,4 наст.ТУ
4. Массовая доля сухого вещества, %	0,7 – I,I	по ГФ XI, с. I76
5. Массовая доля коллагена по оксипролину, % от сухого вещества	97,0–99,0	по п. 3.6 наст.ТУ
6. Общее микробное число, клеток/г продукта, не более	$I0^3$	по п. 3.7 наст.ТУ

ВНЕДРЕНИЕ

в

ПРОИЗВОДСТВО

Приложение 29



ЛЕКАРСТВЕННЫЙ СОСТАВ «АМИНАКОЛ»

Авторы: *С. А. Каспарьянц, Т. В. Ипполитова, Н. В. Месрохова, А. И. Сапожникова, В. П. Финник*

Аминакол — препарат, обладающий пролонгированным стресс-протективным действием.

Может быть использован при проведении различных зооветеринарных мероприятий. Особенно эффективен для профилактики транспортного, адаптационного, технологического стрессов.

Препарат представляет собой комплексное соединение аминазина с коллагеном.

При введении не оказывает местного раздражающего эффекта.

Имеет короткую индукционную фазу и проявляет свое действие через 15—30 мин после введения.

Седативное действие препарата сохраняется до 48 ч и более.

Для предотвращения отрицательных последствий, возникающих в результате стрессовых состояний у животных, аминакол назначают однократно внутримышечно в дозе 1—4 мг/кг (0,015—0,06 мл/кг) живой массы. В случае необходимости действие аминакола можно продлить посредством вторичной инъекции препарата через 24—48 ч.

В период действия аминакола снижается агрессивность животных, купируются различные виды возбуждения, регулируется обмен веществ, усиливаются анаболические процессы, уменьшается отрицательное влияние стрессов на биохимические показатели и показатели массы животных.

Авторское свидетельство СССР № 1254599.

Разработчик: Московская ордена Трудового Красного Знамени ветеринарная академия им. К. И. Скрябина.

Адрес: 109472, Москва, ул. Академика Скрябина, 23.

ЦИКЛОФОС ДЛЯ БОРЬБЫ С ПУХОЕДАМИ НА КУРАХ

Авторы: *В. М. Макушенко, В. И. Баранов, Р. Д. Гареев, В. А. Талан, В. В. Репин*

Циклофос — отечественный инсектоакарицид.

Рекомендуется для обработки кур, зараженных пухоедами, методом опрыскивания с целью профилактики инфекционных заболеваний и предотвращения снижения мясной и яичной продуктивности. Циклофос применяют в виде 0,25%-ной эмульсии из расчета 50—100 мл на птицу в период пара-

Приложение 30

УТВЕРЖДАЮ
Главный ветеринарный врач
Совхоза "Гжельский"
О.Д.Макущенко
"__" февраля 1991 г.

А К Т

Мы, нижеподписавшиеся ст.ветеринарный врач совхоза "Гжельский" Чижин В.П., бригадир Иночкина М.А., ст.научный сотрудник Московской ветеринарной академии Финник В.П. составили настоящий акт в том, что в период с апреля 1990 г по январь 1991 года на Центральном отделении совхоза проведено производственное испытание препарата витакол. Препарат витакол испытан в качестве средства для профилактика авитаминоза у бычков-молочников, завозимых на доращивание.

Витакол -это комплекс водорастворимых витаминов группы В, иммобилизированных на коллагене. Срок изготовления препарата апрель 1990 г. Срок годности один год.

В период опыта было организовано две группы бычков, которым через сутки с момента завоза вводили внутримышечно витакол в дозе 0,1 мл на кг массы животного. Повторное введение осуществляли через 12-14 дней. Бычкам контрольной группы вводили физиологический раствор, в котором были растворены витамины, входящие в состав витакола.

При внутримышечном введении витакола болезненность в области инъекции отсутствовала.

Биохимическими исследованиями крови телят, завозимых на доращивание установлено пониженное содержание витаминов группы В и аскорбиновой кислоты. Однократное введение водорастворимых витаминов в физиологическом растворе повышает уровень витаминов в крови на короткий срок 2-3 дня, тогда как при введении витакола стабильная концентрация витаминов сохраняется в течение 7-14 суток.

Применение молодняку витакола уменьшает степень заболеваемости бронхопневмонией, повышает адаптивную способность, прирост живой массы в пределах 10,7 - 12,8%, сохранность.

При применении препарата не установлено побочных реакций, отхода молодняка.

В.П.Чижин
М.А.Иночкина
В.П.Финник

ЭФФЕКТИВНОСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ АМИНАВИТА И ВИТАКОЛА ПРИ ДЕГЕЛЬМИНТИЗАЦИИ КУР

Для обеспечения нормального физиологического состояния птицы при различных формах ее стресса, в частности, при плановых дегельминтизациях птицы, в качестве антистрессового средства и для улучшения продуктивности нами были применены в условиях Госплемптицезавода 4 "Кубинский" (КБ АССР) новые комплексные препараты: аминавит и витакол, разработанные в лаборатории фармакологии Московской ветеринарной академии им. К.И.Скрябина.

С целью улучшения влияния препаратов на продуктивность кур-несушек при плановых дегельминтизациях был проведен опыт с мая по июль 1988 года на 1000 гол. кур-несушек породы Нью-Гемпшир, в возрасте 5 месяцев.

Опыт продолжительностью 95 дней разделен на 2 периода: подготовительный (5 дней) и опытный (90 дней).

В подготовительный период вся птица (1000 голов) по принципу аналогов была разделена на две группы: опытную (500 голов) и контрольную (500 годов).

В опытный период все куры получали одинаковый рацион. Кормление птицы проводили в соответствии с нормами ВНИТИП (1982). Условия содержания подопытной и контрольной птицы были идентичными.

Контрольное поголовье птицы подвергалось дегельминтизации согласно действующей инструкции ГУВ МСХ СССР (1981), но вышеуказанные препараты в рацион им не включали.

Опытному птицепоголовью препараты вводили в комбикорм в составе премикса по следующей схеме: готовили смесь: 50 г аминавита равномерно размешивали с 1810 г наполнителя (пшеничные отруби) и добавляли к ней 185 мл тривитамина. Эту смесь вводили в корм птице в дозе 0,01 г/кг перед дегельминтизацией в течение 2-х дней подряд и сразу после дегельминтизации одновременно с препаратом витакол в дозе 0,05 мл/кг в течение 5 дней, ежемесячно.

В период испытаний препаратов учитывали сохранность птицепоголовья и их общее состояние, продуктивность птицы (яйценоскость и привесы), а также качество яиц. Ежедекадно взвешивали по 30 голов птицы из каждой группы и ежемесячно по 30 штук яиц.

Введение препаратов в корм до после дегельминтизации кур способствовало повышению устойчивости кур-несушек к неблагоприятным факторам внешней среды, что сказалось на сохранности птицы (табл.1).

Таблица I.

Группы	Сохранность по месяцам опыта (%,%)			В среднем за период опыта
	май	июнь	июль	
Опытная	98,4	98,9	99,I	98,8
Контрольная	97,7	97,8	98,2	97,9
Разница к контр. группе (+) (-)	+0,7	+I,I	+0,9	+0,9

Из таблицы I видно, что сохранность кур-несушек, получавших препараты, была в течение всего опыта выше, чем у контрольных на 0,9%.

Применение аминавита и витакола оказало положительное влияние на живой вес кур (табл.2)

Таблица 2

Группы	Кол-во голов	Средний живой вес I головы (г)				Привес I гол. за период опыта (г)
		Подготовительный период	Опытный период			
			май	июнь	июль	
Опытная	30	I540	I620	I7I0	I800	260
Контрольная	30	I540	I6I0	I690	I770	230
В %,% к контрольной группе	-	I00	I00,6	I0I,2	I0I,7	II3,0

Из таблицф 2 видно, что средний живой вес кур -несушек опытной группы в среднем за опыт был выше, чем уконтрольной на I,2%, а привес на I3%.

Также положительное влияние препараты оказали на яйценоскость кур (табл.3)

Таблица 3

Группы	Получено всего яиц от опытной и контрольной группы и средняя яйценоскость на курицу-несушку											
	май			июнь			июль			в среднем за опыт		
	Всего яиц шт.	на несушку шт.	%	Всего яиц шт.	на несушку шт.	%	Всего яиц шт.	на несушку шт.	%	Всего яиц шт.	на несушку шт.	%
Опытн.	233	7,5	46,5	286	9,5	57,I	326	I0,5	652	282	9,2	56,
Контр.	220	7,I	44,I	276	9,2	55,3	303	9,8	607	267	8,7	53,
В %,% к контр. группе	I05,9	-		I03,6			I07,6			I05,6		

Из таблицы 3 видно, что яйценоскость опытных кур-несушек была в среднем за опыт на 5,6% выше, чем у контрольных.

Добавление указанных препаратов в рацион кур-несушек оказало положительное влияние на качество яиц (табл.4)

Таблица 4.

Группы	Кол-во витамина в 1г.желтка яиц (мкг)		Кол-во каротина в 1г. желтка яиц)(мкг)	Средний вес яиц по месяцам (г)		
	A	B_2		май	июнь	июль
Опытная	8	6	I6	38	46	52
Контрольн.	7	5	I5	37	43	50
В %,% к контролю	II4,3	I20,0	I06,6	I02,7	I07,0	I04,0

Из таблицы 4 видно, что средний вес яиц от опытных кур-несушек в течение опыта был на 4,6%, а содержание витаминов A, B_2 и каротина в яйце соответственно на I4,3%, 20%, и 6,6% выше чем у контрольных.

Заключение.

Результаты опыта свидетельствуют о том, что добавление аминавита и витакола в корм птице до и после дегельминтизации в дозе, соответственно: 0,0I г/кг и 0,05 г/кг веса птицы соответствует улучшению обмена веществ, устранению последствий стрессов и, как результат, повышению продуктивности птицы, улучшению качества продукции.

Экономический эффект вышеуказанных новых комплексных препаратов выражается в повышении сохранности птицепоголовья на 0,9%, яйценоскости на 5,6%, увеличению привесов на I,2% и качества яиц по составу и весу.

Аспирант ВИГИС
ветврач М.Кожохов

Методически опыты проведены правильно.
достоверность полученных данных подтверждаю.

Научный руководитель, лауреат Государственной премии СССР, доктор ветеринарных наук, профессор Д.И.Панасюк
I0.08.88 г.

Копия верна: ст. науч. сотр. лаборатории товароведения и технологии животного сырья

Приложение 32

КОСМЕТИЧЕСКОЕ ОБЪЕДИНЕНИЕ

"СВОБОДА"

Почтовый адрес:
Москва, 125015,Вятская,47
Телет.:113435 «Сафьян»
Р/с 40702810802600001458
АКБ «Мосбизнесбанк»
БИК 044541312, ИНН 7714078157

285-17-19 (генеральный директор)
285-82-75 (главный бухгалтер)
285-81-27 (отдел продаж)
285-82-78 (снабжение)
285-57-67, 285-11-90 (факс)

Открытое Акционерное общество

№ 07/15 "12" 08 1999 г.

Ректору Московской государственной
академии ветеринарной медицины и
биотехнологии им. К.И. Скрябина

академику РАСХН
профессору Воронину Е.С.

В научном центре КО "Свобода" проведена апробация препаратов коллагена, эластина, кератина, разработанных ведущим научным сотрудником лаборатории товароведения и технологии животного сырья к.б.н. Сапожниковой А.И. с соавторами. Препараты использованы при разработке рецептур косметических изделий: очищающее молочко "Карина", молочко для тела "Карина", молочко после загара "Sun life", крем для бритья "Комильфо", которые были соответственно внедрены в производство.

Косметические изделия, содержащие выше указанные биологически активные добавки прошли медицинские исследования в институте "Пластической хирургии и косметологии" МЗ России, где получили высокие положительные оценки по эффективности воздействия.

Препараты коллагена, эластина и кератина современны и актуальны ,могут быть использованы при разработке косметических изделий нового поколения.

И.о. директора научного центра Алавердиева С.И.

Приложение 33

Moldova 2069 Kishinau, 1 Mesager street
tel. 0422 759674,750851 fax 0422 742686
count 2251104011191
AKB "Moldova-Agroindbanc" branch "Miron Costin"

Молдова 2069 Кишинэу, ул.Месаджер 1
тел.0422 759674,750851 факс 0422 742686
р.с. 2251104011191
АКБ "Молдова-Агроиндбанк" филиал "Мирон Костин"

VIORICA-COSMETIC S.A.

Societatea pe Actiuni
VIORICA-COSMETIC
12/338
04

С П Р А В К А

Выдана научному сотруднику лаборатории товароведения и технологии животного сырья Московской Государственной Академии ветеринарии и технологии им. К.И.Скрябина Сапожниковой Алле Ионовне в том, что АО "Виорика-Косметик" в своих косметических изделиях использует продукты, разработанные и произведенные на базе Академии:

- Крем для лица с коллагеном "Виктория" - РЦ IOMCCP 036-I8-89
- Крем для лица с эластином "Виорела" -РЦ 7I-05692288-II4-94
- Шампунь с коллагеном и кератином "Виорела" -РЦ 7I-05692288-I37-95
- Шампунь с коллагеном и кератином "Тави" - РЦ 7I-05692288-I38-95

Все изделия прошли экспериментально-клиническую апробацию, получили положительное заключение о потребительских свойствах и поставлены на производство.

Генеральный директор Н.Ф.Бодур
Главный косметолог М.А.Пчелина