

АКАДЕМИЯ НАУК РЕСПУБЛИКИ УЗБЕКИСТАН

КАРАКАЛПАКСКИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ИНСТИТУТ ЕСТЕСТВЕННЫХ НАУК КАРАКАЛПАКСКОГО
ОТДЕЛЕНИЯ АКАДЕМИИ НАУК РЕСПУБЛИКИ УЗБЕКИСТАН

ХАЖИБАЕВ К. Г., БЕРДИМБЕТОВА Г.Е.,
ОЩЕПКОВА Ю.И., САТИМОВА М.Р.

**ХИМИЧЕСКИЙ СОСТАВ И БИОЛОГИЧЕСКИЙ
АКТИВНОСТЬ СОЕДИНЕНИЙ БЕЛКОВОЙ
ПРИРОДЫ ЦИСТ АРТЕМИИ
АРАЛЬСКОГО МОРЯ**

НУКУС
«AVANGARD-BASPA»
2024

УДК 591.524.12:544.77

ББК 28.691.9

X-69

К.Хажобаев и др. Химический состав и биологическая активность соединений белковой природы цист артемии Аральского моря. [Текст]: – нукус, «Avangard-baspa», 2024. – 124 стр.

В монографии представлены методы и количественные данные органолептического и физико-химического состава цист артемии Аральского моря, содержания компонентов органических соединений, витаминов, аминокислот и жирных кислот. Кроме того, приведены сведения по определению острой токсичности и использованию в качестве биологически активных веществ в пищевой промышленности.

Монография, предназначена для магистрантов, докторантов и самостоятельных исследователей профильных вузов, обучающихся по специальности «Общую и органическую химию и биоорганическую химию».

Ответственный редактор:

АБЫЛОВА А.Ж. – доктор философии технических наук (PhD), старший научный сотрудник.

Рецензенты:

ТУРЕМУРАТОВ Ш.Н. – доктор химической наук, профессор.

ТУРЕНИЯЗОВА Д.А. – кандидат химической наук, доцент.

Рекомендовано в печать на основании приказа №3 от 10.09.2024 года Республиканского координационного совета ККО АН РУз.

© ХАЖИБАЕВ.К. и др., 2024.

ISBN 978-9910-8920-7-3

© Издательство «AVANGARD-BASPA», 2024.

ВВЕДЕНИЕ

В мире, в последние годы широко развивается новое направление в пищевой промышленности, так называемое функциональное питание. Оно способствует улучшению и сохранению здоровья путем обеспечения организма необходимыми питательными веществами, в том числе обогащенными различными биологически активными пищевыми добавками. К их числу относятся продукты, за счет которых обеспечивается 25% потребности в белках животного происхождения, определяющих большое значение в питании человека. Известно, что цисты артемии содержат более 40% общего белка и биологически активных веществ, использование которых позволяет создавать многие биологически активные добавки (БАД), функциональные продукты питания. Кроме того, использование цист артемии играет важную роль в повышении эффективности ветеринарных препаратов, парфюмерии, косметологии и средств гигиены.

В настоящее время в мире, проводятся научные исследования по изучению структуры и активности БАД из природных источников с целью предотвращения ухудшения рационального питания, вызванных как кризисным состоянием производства продовольственного сырья и пищевых продуктов, так и резким снижением покупательной способности большей части населения страны. В связи с этим в создании БАД исследованию органолептических и физико-химических свойств качества цист артемии; разделению белково-пептидных компонентов и определению их физико-химических свойств; изучению биологической и фармакотоксикологической активности изолированных компонентов уделяется особое внимание.

В нашей стране особое внимание уделяется созданию высококачественных, гигиенически благополучных продуктов традиционных видов, включая лечебно-профилактического назначения, для отдельных групп населения и достигаются определенные научные результаты. В связи с этим 4-м направлением Стратегии действий по дальнейшему развитию Республики Узбекистан «По дальнейшему развитию фармацевтической отрасли, совершенствованию обеспечения населения и медицинских учреждений дешевыми, качественными лекарственными средствами» определены важные задачи. В связи с этим важно изучить биологически активные вещества в составе цист *Artemia* Аральского моря, изучить их разделение, очистку, структуру и биологическую активность, создание на их основе новых, эффективных пищевых добавок и лекарственных препаратов.

ГЛАВА 1. ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ЦИСТ АРТЕМИИ В ПИЩЕВОЙ ПРОМЫШЛЕННОСТИ И СЕЛЬСКОМ ХОЗЯЙСТВЕ

§ 1.1. ПРИЧИНЫ РАЗМНОЖЕНИЯ ПОПУЛЯЦИИ АРТЕМИИ В АРАЛЬСКОМ МОРЕ

Аральское море когда-то являлось четвертым по величине континентальным водоемом в мире. В связи с резким сокращением в последние десятилетия притока воды в Аральское море, его площадь сократилась более чем в 6 раз, объем в 8 раз, уровень упал на 20 м, море разделилось на два водоема – Малый Арал и Большой Арал [1]. В результате, минерализация воды в Большом Арале возросла более чем в 10 раз, достигнув к настоящему времени 100 г/л в Западном бассейне и более 150 г/л в Восточном бассейне, т. е. Большой Арал перешел в разряд гипергалинных озер. В настоящее время Аральское море является крупнейшим в мире гиперсоленным водоемом [2].

Как следствие – это привело к кардинальным изменениям в составе Аральской биоты, из которой практически исчезли местные виды животных [3].

Несмотря на огромные потери в видовом разнообразии, современную экосистему Арала нельзя назвать умирающей. В нем живут и активно функционируют специфические, но вполне жизнеспособные биологические сообщества, приспособленные к сверхвысокой солености. Одним из таких видов является жаброногий рачок *Artemia parthenogenetica*, типичный обитатель гипергалинных водоемов, который появляется в планктоне Аральского моря с конца 1990 г [4].

С дальнейшим повышением минерализации воды Аральского моря потенциальные пищевые конкуренты артемии (главным образом ракообразные, коловратки и двустворчатые моллюски) и потенциальные потребители артемии (рыбы) к концу 1990-

х гг. резко сократили свое разнообразие и численность. В обедневшем планктонном сообществе для артемии сложились благоприятные условия для выживания. Как правило, артемия достигает заметного развития только в водоемах, где отсутствуют конкуренты и хищники, поскольку ее практически единственным «оружием» в борьбе за существование является исключительная солевыносливость [5].

С 1990-х годов многочисленные международные научные исследования описали экосистемы Арала в их переходе от олигогалинного к гиперсоленому водоему, включая постепенную колонизацию открытой части озера партеногенетической популяцией артемии [6].

В планктоне Аральского моря рачок *Artemia parthenogenetica* Barigozzi появился с конца 1998 г. и проявил признаки успешной колонизации, являясь единственным выжившим видом ракообразных [7].

Принимая во внимание значительный размер Аральского моря, есть все основания предполагать, что Арал может стать весьма значительным ресурсом цист артемии. Подтверждением этому является и современная тенденция развития экосистемы Большого Арала, со временем обеспечивающая для артемии необходимую ему бесконкурентную среду и доминирующее положение. Становится вполне реальным превращение Аральского моря в крупнейший «артемиевый» водоем планеты [8].

Заселение артемией открытой акватории Большого Арала представляет интерес и в практическом отношении, поскольку артемия является хозяйственно важным видом водных животных [9].

В настоящее время популяция, населяющая Западный бассейн Большого Арала, проявляет признаки успешной колонизации, но не демонстрирует наличия объема, достаточного для начала промышленной заготовки цист. Следует принять во внимание, что проведение несвоевременной и слишком интенсивной заготовки

цист может поставить под угрозу успешно развивающуюся колонизацию артемии в Аральском море [10].

Для устойчивого использования ресурса артемии Аральского моря необходимы знания о состоянии популяции аральской артемии, а также экологический мониторинг для определения потенциальной пригодности Арала в качестве среды обитания, в которой можно ожидать стабильный рост популяции артемии. Результаты экологических и физиологических исследований послужит основой для рационального использования и воспроизводства этого естественного биологического ресурса [11].

§ 1.2. *Artemia salina* – заселенность и биологическая активность

Артемия (лат. *Artemia salina*) – вид ракообразных из класса ракообразных *Anostraca*. Взрослые рачки достигают длины 10–20 мм, а науплии (личинки) артемии, имеют размеры примерно 0,3 мм. Живут эти рачки исключительно в соленых водоемах, в которых не выживают другие организмы [12].

Артемии — это собирательное название водных ракообразных рода *Artemia*. Особую ценность эти рачки приобрели в аквариумистике в качестве корма для рыб и мальков. Они размножаются с помощью цист (яиц), которые могут храниться на протяжении длительного времени при различных условиях. Таким образом, высушенная циста является наиболее удобной формой живого корма. Ежегодно реализуется свыше 2000 тон этого продукта по всему миру [13].

Артемии встречаются практически на всех континентах. Обитают в солёных озёрах при уровне солёности от 25‰ до 250‰ (25–250 г/л). Подобные концентрации смертельны для большинства живых организмов, но в процессе эволюции эти рачки сумели адаптироваться к этим суровым условиям, тем самым заняв экологическую нишу, в которой отсутствуют хищники, а они являются высшей формой жизни [14].

Циста - замершая эмбриональная стадия развития артемий, вызванная агрессивной внешней средой (рисунок 1.1). Эмбрионы могут находиться в состоянии покоя на протяжении нескольких десятилетий, пока не окажутся в благоприятных для себя условиях. Именно спящие цисты широко используются в коммерческих целях [15].

Цисты имеют крошечные размеры, всего 0,2–0,25 мм в диаметре. Внешняя оболочка надёжно защищает как от сильных морозов, так и от летнего зноя. Кроме того, она обладает особой структурой поверхности, позволяющей цепляться, например, за перья перелётных птиц, и тем самым артемии мигрируют на дальние расстояния [16].

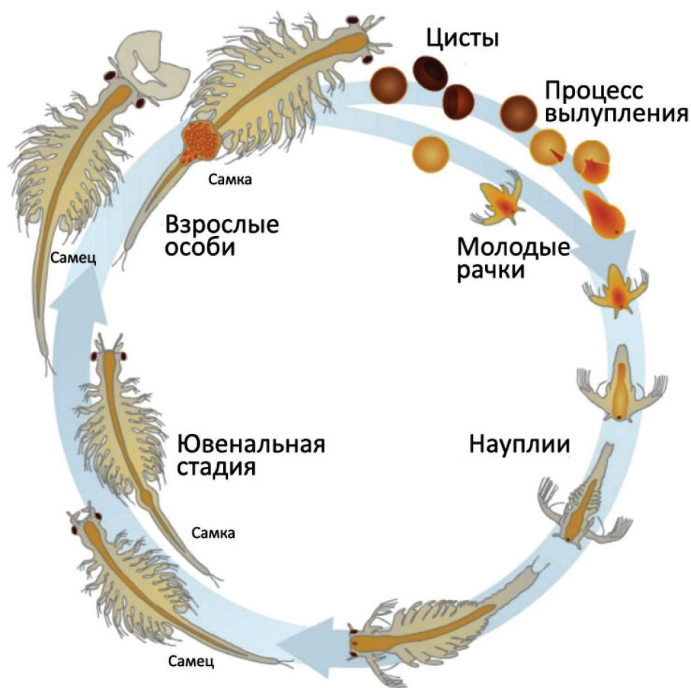


Рисунок 1.1. Жизненный цикл артемий.

В Узбекистане рачки артемия водятся в Аральском море. Появление артемии в Большом Арале обусловлено рядом сопряженных факторов. Прежде всего, с достижением морских вод солености 60‰ произошла элиминация многих ее хищников (рыб, креветок, крабов) и конкурентов (каланипеды, личинок крабов и креветок). В обедневшем планктонном сообществе для артемии сложились благоприятные условия для выживания [17].

Заселение артемией открытой акватории Большого Арала представляет интерес в практическом отношении, поскольку артемия является хозяйственно важным видом водных животных. Яйца артемии используются как стартовый корм при разведении креветок и ценных видов рыб и обладают неограниченными экспортными возможностями. Годовая мировая добыча яиц артемии превышает 7000 тонн (в 1 грамме содержится более 200 тыс. яиц). В качестве корма для рыб и креветок ежегодно используется также более 10 000 т. биомассы артемии. При этом до 90% яиц артемии добывается в Большом Соленом Озере в США, площадью 4650 км², что, учитывая ежегодные климатические колебания, самым негативным образом влияет на мировой рынок яиц артемии [18].

Количество рачков в соленых минерализованных озерах может достигать огромной цифры и в течение летного периода дает несколько поколений особей. Рачки способны в себе концентрировать жирные кислоты и химические элементы: железо, медь, марганец, ванадий, титан, свинец, серебро и др. [19].

Цисты артемии широко используются в косметологии для регенерирующего и стимулирующего воздействия на клетки кожи [20].

Достоверно установлено, что цисты артемии обеспечивают обновление клеток путем привлечения энергии к клеткам кожи. Использование компонентов цист артемии имеет следующие преимущества: защита от агрессивного воздействия

окружающей среды, естественное укрепление иммунитета кожи, стимулирование регенерации кожи, защита от ультрафиолетовых лучей, выведение токсинов, улучшение цвета кожи, поддержание водно-липидного баланса [21].

Ценной особенностью яиц артемии является высокое содержание протеина (до 72,9%), достаточное количество аминокислот (незаменимые аминокислоты: лейцин-19,5 г/кг; лизин-37,6-50,1; валин-20,2; фенилаланин-17,9; метионин-15,2-16,7; гистидин-25,6; триптофан-1,2-4,07; треонин-14,3; изолейцин-17,1) [22].

Яйца имеют высокое содержание витаминов: каротиноиды-73,63 мг/кг; витамин В1-13,6 мг/кг; В3-43,97 мг/кг; В5-97,77 мг/кг; В6-17,0 мг/кг; В7-3,13 мг/кг; В12-31,4 мг/кг, макро- и микроэлементов в том числе кобальт, йод, цинк, марганец, медь [23, 24].

§ 1.3. Общая характеристика рода Артемии

Ракообразные артемии встречаются по всему миру, кроме Антарктиды, в морской воде и соленых озерах. Впервые он был зарегистрирован в 982 г. неизвестным иранским географом на озере Урмия [25], затем в 1756 году англичанин Schlösser определил оба пола [26]. В 2001 году Мартин и Дэвис Артемия разработали таксономический статус вида [27].

Тип: *Crustacea Brünnich*

Класс: *Branchiopoda Latreille*

Подкласс: *Sarsostraca Tasch*

Отряд: *Anostraca Sars*

Семья: *Artemiidae Grochowski*

Род: *Artemia Leach*

- *A. salina* (Linnaeus, 1758): Средиземноморье
- *A. monica* Verrill, 1869: США (озеро Моно, Калифорния)
- *A. urmiana* Günther, 1899: Иран (озеро Урмия; провинция Западный Азербайджан)

- *A. franciscana* Kellogg, 1906 г.: Америка, Карибский бассейн и острова Тихого океана.
- *A. persimilis* Piccinelli & Prosdocimi, 1968: Южная Америка.
- *A. sinica* Cai, 1989: Центральная и Восточная Азия.
- *A. tibetiana* Abatzopoulos, Zhang & Sorgeloos, 1998: Китай (Тибет)
- *Artemia* sp. Пилла и Бирдмор, 1994: Казахстан
- Партеногенетическая популяция артемии: Европа, Африка, Азия и Австралия.

Биохимические, цитологические и генетические исследования, проведенные позднее, подтвердили разобщенность выделенных видов. Партеногенетические расы, не определенные до вида, принято объединять в одну общую группу неопределенных видов—*Artemia parthenogenetica* [28].

Большинство артемий, обитающих на территории Восточной Европы и Азии относятся к одному из следующих видов – *Artemia tunisiana*, *Artemia species* или *Artemia parthenogenetica*. Последний термин объединяет некоторое количество популяций, имеющих между собой небольшие генетические различия. В этой большой группе существуют популяции, способные размножаться без участия самцов. В плане пищевой ценности разницы между всеми ними практически не существует, а идентифицировать отдельные виды и подвиды бывает зачастую довольно сложно, поскольку рачки артемии способны изменять внешний вид в зависимости от условий обитания [29].

Артемия обитает в хлоридных, сульфатных и содовых водоемах при разных концентрациях солей в воде, выдерживает повышение солености до 300 ‰, понижение до 10 ‰ и ниже. Обитая в водах высокой солености, она почти избавлена от врагов и конкурентов, что способствует образованию популяций высокой численности и биомассы. Питается артемия фитопланктоном. По способу размножения выделяют две расы – двуполоую и партеногенетическую [30].

Жаброногий рачок артемия стал в последние десятилетия самым популярным видом, в качестве кормов как для морских, так и для пресноводных рыб, разводимых в любом количестве – от домашних аквариумов до промышленных водоемов. Это удивительное создание заслужило свою репутацию не только и не столько благодаря своей питательной ценности, но и способу размножения и способности выживания в самых экстремальных условиях [31].

Артемия имеет большое значение для науки, хозяйства и фармацевтической отрасли. Её химический состав характеризуется высоким содержанием белков, жиров, незаменимых аминокислот и жирных кислот, витаминов, гормонов и других биологически активных соединений. Особую ценность и биологическую значимость имеют цисты рачка, они являются богатым источником нуклеиновых кислот [32].

§ 1.4. Биологическая активность некоторых соединений белковой природы цист артемии

Воздействие биохимических соединений на цисты Артемии на лейкозные клетки. Увеличилось количество исследований, посвященных морским биоактивным материалам [33]. Многие пептиды и другие биоматериалы с противораковым потенциалом были извлечены из различных морских животных [34]. Экстракты артемии нашли применение в косметике для защиты от солнца и средствах против старения [35]. Исследование механизма действия Huang показало, что модуляция гидрофобности пептидов играет решающую роль против раковых клеток [36]. Сообщается, что пептиды с низкой молекулярной массой обладают большей молекулярной подвижностью и диффузией, чем пептиды с высокой молекулярной массой, что, по-видимому, улучшает взаимодействие с компонентами раковых клеток и усиливает противораковую активность [37].

Исследование, проведенное *Abdolkhaleg Deezagi*, позволило выделить и очистить белки *Artemia Urmiana*. Шесть прозрачных фракций (A-F), полученных при хроматографии на DEAE-целлюлозе, анализировали на влияние на рост, дифференцировку и апоптоз клеток с использованием линии клеток лейкемии HL-60 человека. Анализ пролиферации клеток с помощью тестов МТТ и BrdU показал, что полученные фракции не влияют на рост клеток. Клетки, обработанные неочищенным экстрактом и фракциями А, В и С показали увеличение роста клеток в зависимости от дозы. Стимулирующие эффекты фракции D наблюдались при концентрациях 10 мкг/мл и выше. В анализах восстановления нитросинего тетразолия (NBT) обработка 100 мкг/мл фракции Е или F в течение 96 часов увеличивала фракцию дифференцированных клеток до $14,8 \pm 3,5\%$ и $16,5 \pm 2,1\%$, соответственно. Комбинация этих фракций с ретиноевой кислотой оказывала значительный синергетический эффект на дифференцировку клеток ($56,8 \pm 3,7\%$ и $67,4 \pm 4,2\%$, $p \leq 0,01$). Окрашивание аннексином-V FITC для анализа апоптоза и проточной цитометрии показало индукцию апоптоза фракциями Е и F до 23,8 и 31,8% клеток. [38].

Противомикробные пептиды. В ряде исследований было проведено изучение применения артемии в качестве носителя для рекомбинантного эпинецидина-1 в рыбе для повышения иммунитета. Исследование показало, что у рыбок Данио, которых кормили коммерческим кормом в сочетании с артемией, содержащей рекомбинантный пептид эпинецидин-1 в течение 7 дней, в ответ на инфекцию *V. vulnificus* наблюдалась более низкая экспрессия воспалительных генов, таких как фактор некроза опухоли альфа и адаптерный белок рецептора Toll-like [39]

Исследования профилей экспрессии генов, связанных с иммунитетом, проведенные *Chen-Hung Ting*, показали, что прививки *S. iniae* и *V. vulnificus* вызывали различные иммуномодулирующие эффекты у мальков тилапии. После

инфицирования *S. iniae* мальки тилапии, получавшие контрольную диету, проявляли иммунный ответ, в котором доминировал Tlr-7/MyD88, при этом индуцировалась экспрессия Tnf- α , Il-8 и Cxcl-10. В тоже время, мальки тилапии, которых кормили трансгенными цистами эпинецидин-1, демонстрировали доминантный иммунный ответ Tlr-2 / Tlr-5, отмеченный индукцией экспрессии Il-1 β , Il-8 и Il-12. Однако после инфицирования *V. Vulnificus*, у контрольных мальков проявился доминантный ответ aTlr-2 / MyD88 / Traf-6 с активацией экспрессии Tnf- α и Il-8; тем временем мальки тилапии, получавшие трансгенную кисту эпинецидин-1, демонстрировали доминантный Tlr-2 / Tlr-5-опосредованный иммунный ответ, включая индукцию экспрессии Il-1 β , Il-8, Il-12 и Cxcl-10. Полученные данные свидетельствуют о том, что кормление мальков личинок трансгенными цистами артемии эпинецидином-1 обеспечивает повышенный иммунитет к бактериальному заражению. Поэтому трансгенные цисты эпинецидин-1 следует рассматривать как потенциальный функциональный корм для личиночной аквакультуры [40].

Исследования, проведенные Pui Ying Chee, показали, что синтезированный пептид эпинецидин-1 обладает разнообразной фармакологической активностью, включая противомикробные, иммуномодулирующие, противораковые и ранозаживляющие свойства. Он также использовался в различных клинических и сельскохозяйственных областях, в том числе для местного применения в лечении ран, а также для повышения иммунитета рыб в аквакультуре [41].

Белок теплового шока 70. Развивающиеся в яйцеклетке эмбрионы ракообразных *Artemia franciscana* содержат белок теплового шока (Бтш) [42], называемый p26, который, как полагают, играет важную роль в устойчивости к стрессу [43, 44, 45].

Белки теплового шока играют важную роль во время диапаузы многих организмов, включая артемию. Было документально

подтверждено, что белки теплового шока предотвращают повреждение белков и защищают от широкого спектра нарушений окружающей среды во время диапаузы [46].

Бтш70 является важным белком для повышения толерантности науплий *A. franciscana* к различным абиотическим и биотическим стрессорам. По сравнению с контрольными животными выживаемость науплиев, лишенных Бтш70, снижалась примерно на 41% из-за теплового стресса и на 34% при инфекции *Vibrio campbellii*. Было показано, что нокдаун Бтш70 с помощью этого метода является временным, поскольку белок, который изначально не обнаруживался на стадии науплии, экспрессировался на ювильной и взрослой стадиях артемии. Нокдаунные науплии Бтш70 развивались нормально, их морфология сходна с теми, которые накапливают нормальные количества белка [47].

Исследования, проведенные King and MacRae, обнаружили, что белки теплового шока 90 (Бтш90), Бтш70, Бтш60 и малые белки теплового шока (мБтш) синтезируются во время диапаузы, и они могут взаимодействовать при рефолдинге белка после прекращения диапаузы. мБтш связывают денатурированные белки посредством гидрофобных взаимодействий и доставляют их обычно через кофакторы к Бтш70, которые играют важную роль в АТФ-зависимом рефолдинге белков. Бтш90 взаимодействует с Бтп70, повышая эффективность сворачивания белков, и оба шаперона могут секвестрировать белки в отсутствие АТФ. p26, мБтш обильной диапаузы, играет важную роль в развитии эмбриона, поддержании диапаузы и устойчивости к стрессу в цистах Артемии [48, 49].

Elongation Factor-2. Для удлинения полипептидов на рибосомах требуется GTP и два белковых фактора, которые у эукариот обозначаются как EF-1 и EF-2. Фактор элонгации EF-1 опосредует связывание аминоксил-тРНК с рибосомой при гидролизе GTP. После образования пептидной связи на рибосоме

происходит транслокация пептидил-тРНК под влиянием фактора элонгации EF-2 и второго раунда гидролиза GTP. Кислые рибосомные белки из крупных рибосомных субъединиц важны во всем этом процессе [50].

Спящие инцистированные эмбрионы в рассоле креветок *Artemia* неактивны в синтезе белков, и бесклеточные экстракты этих эмбрионов неспособны транслировать эндогенную мРНК. Однако различные бесклеточные системы из спящих цист активны в поли (U) направленном синтезе белка. Эти последние исследования показали, что EF-1 и EF-2 присутствуют и активны в экстрактах из спящих цист. Тем не менее, бесклеточные системы, происходящие из спящих цист, менее активны в поли (U) трансляции, чем системы, полученные из развитых эмбрионов. Slobin и Moller продемонстрировали, что EF-1 претерпевает трансформацию размера из тяжелой формы в легкую во время раннего развития *Artemia*, и они предположили, что этот механизм может обеспечивать средство, с помощью которого скорость синтеза белка изменяется во время эмбриогенеза. Исследования Warner et al. показали, что белок из спящих цист артемии, который напоминает EF-2, действует на уровне элонгации, ингибируя трансляцию поли (U) *in vitro*. Следовательно, EF-2 может играть центральную роль в регуляции синтеза белка на раннем этапе развития артемии [51].

Артемин и Ферритин. Термин артемин впервые был использован Slobin для обозначения белка p26 в артемии, но был использован намного позже для обозначения члена семейства нейротрофических факторов, происходящих от линии глиальных клеток. Кроме того, было показано присутствие белкового комплекса у артемии, названного комплексом 19S [52].

Артемин является основным белком инцистированных эмбрионов артемии, составляющим около 12% растворимого клеточного белка, но почти полностью отсутствует у личинок

науплиусов [53]. По данным деградации по Эдману, мономеры артемина состоят из 229 аминокислотных остатков и имеют молекулярную массу 25 976 Да. Артемин и ферритин имеют сопоставимые первичные структуры, хотя артемин на 45-50 остатков длиннее, чем большинство ферритинов, и они образуют олигомеры аналогичного размера [54]. Так, очищенный артемин имеет константу седиментации 19S и молекулярную массу 573–610 кДа, вероятно, состоящую из 24 субъединиц. Было высказано предположение, что субъединицы связаны межмолекулярными дисульфидными мостиками [55]. Электронно-микроскопическое исследование артемина выявило монодисперсный комплекс розеточного вида. Ферритины позвоночных имеют длину около 180 аминокислотных остатков и состоят в различных соотношениях из двух высококонсервативных субъединиц, H и L [56]. Несмотря на то, что артемин и ферритин обладают сходной структурой и временной экспрессией, они почти наверняка выполняют разные функции во время развития артемии. Кроме того, анализ мРНК ферритина и артемина позволяет предположить, что экспрессия генов обоих белков регулируется у артемии в процессе развития [57].

Белки La-семейства. Белки La ограничены ядром и полностью эволюционируют в эукариотических клетках. Структурный анализ этих белков привел к их классификации на пять семейств, а именно на настоящие гомологи La и четыре семейства Lar_p: Lar_p1, 4, 6 и 7 [58]. Белки La содержат два РНК-связывающих мотива (RRM) и мотив La, и имеют важные функции в метаболизме РНК. Эти белки взаимодействуют с широким спектром клеточных РНК и проявляют активность, способствуя метаболизму растущих транскриптов pol III, связываясь с их общими UUU-3'ОН-содержащими концами, и модулируя трансляцию определенных мРНК с участием неизвестного механизма связывания [59].

При определенных условиях зрелые самки производят и выпускают инцистированные эмбрионы гастролы (также называемые цистами), которые входят в диапаузу, состояние облигатного покоя. Различные сигналы окружающей среды приводят к непрерывному (прямому) эмбриональному развитию, что приводит к выпуску плавающих личинок науплиуса [60]. Особенностью эмбрионов с диапаузой, является полное отсутствие деления клеток и синтеза ДНК во время эмбриональной диапаузы [61]. Диапауза может быть прекращена определенными условиями окружающей среды, что приводит к активации постдиапаузовых эмбрионов. Примечательно, что эти активированные инцистированные эмбрионы развиваются без какого-либо синтеза ДНК или клеточного деления и в конечном итоге вылупляются как личинки науплиуса, после чего синтез ДНК и деление клеток возобновляются [62]. Модель *Artemia* изображает адаптацию как сложную реакцию на критические условия жизни, объединяющую и уточняющую прошлый и настоящий опыт на всех уровнях организации [63].

В исследовании, проведенном Dian-Fu Chen, для выяснения молекулярного механизма, лежащего в основе остановки клеточного цикла, и его связи с регуляцией тРНК ядерно-цитоплазматического переноса, диапауза артемии была использована в качестве модели остановки клеточного цикла. В этом исследовании было обнаружено, что связывающий РНК и родственный La белок, названный Ar-Lar_p, накапливается в ядре в ответ на остановку клеточного цикла, что привело к образованию диапаузы артемии за счет связывания с тРНК. Механизмы, лежащие в основе регуляции остановки клеточного цикла с помощью Ar Lar_p, были обнаружены на раковых клетках с использованием экзогенной трансфекции и экспрессии гена Ar-Lar_p. Остановка клеточного цикла, индуцированная ретроградным движением тРНК из цитоплазмы в ядро, была

продемонстрирована на раковых клетках. Наши результаты показали, что транспорт тРНК регулирует митогенез и пролиферацию клеток через контрольные точки клеточного цикла, процесс, который опосредуется множеством сигнальных путей, включая гистон H3, ацетилованный по лизину 56 (H3K56ac), киназу, регулируемую внеклеточными сигналами (ERK), и Akt. Таким образом, Arg-Larp представляет собой вышестоящий сигнал транспорта тРНК, который регулирует развитие клеточного цикла в ответ на стрессы окружающей среды [64].

Врожденная иммунная система. Хотя иммунная система 45 000 позвоночных и более 10 миллионов беспозвоночных сильно отличается, у них есть общий предок, живший сотни миллионов лет назад, что привело к общей врожденной иммунной системе [65]

Врожденный иммунный ответ ракообразных состоит из нескольких рецепторов и путей, которые могут сильно различаться у разных видов. Присутствуют три общие защитные системы: физический барьер, а именно экзоскелет и пищеварительный тракт, клеточные защитные механизмы и гуморальные защитные реакции, ответственные за производство иммунных белков, антимикробных пептидов и ингибиторов протеиназ. Клеточные реакции, такие как фагоцитоз, клубенькообразование и инкапсуляция, запускаются соединениями, присутствующими в гемолимфе [66].

Иммунные гены. Размер генома *Artemia franciscana* был оценен в 2013 году De Vos и его коллегами с помощью проточной цитометрии. Размер генома взрослого гаплоида оказался 0,93 10⁹ п.о., что является небольшим размером генома для ракообразных. Креветки, например, имеют размер генома примерно 2 10⁹ п.о. Иммуностимуляторы используются в качестве альтернативы антибиотикам в борьбе с болезнями в аквакультуре. До сих пор мало что известно о том, как эти соединения влияют или влияют на экспрессию генов экспонированных науплий артемии [67].

Sofie Vanmaele и его коллеги исследовали восемь генов, которые коррелируют с врожденным иммунным ответом беспозвоночных: пропенолоксидаза, трансклутаминаза, белок теплового шока 70, маскарон подобный белок, внеклеточная супероксиддисмутаза, пероксинектин, липополисахарид и β -1,3-глюкан-связывающий белок и Молекула адгезии клеток синдрома Дауна [68].

Трансклутаминаза и пропенолоксидаза являются известными индикаторами иммунного ответа, который помогает бороться с инфекцией, и белком теплового шока 70, который является иммуномодулятором и может активироваться после заражения. *Трансклутаминазы* — это ферменты, участвующие в системе свертывания крови и в процессе линьки, которые предотвращают потерю крови и помогают препятствовать проникновению патогенов в рану [69]. Они вырабатываются гемоцитами беспозвоночных в ответ на повреждение тканей. Система активации пропенолоксидазы важна для иммунной системы ракообразных, поскольку она является одним из основных механизмов иммунной защиты беспозвоночных животных от нескольких патогенов. Белки теплового шока участвуют в сворачивании и разворачивании других белков и индуцируются, когда хозяин подвергается воздействию высоких температур или других стрессовых факторов. Белок теплового шока 70 может быть, как внутриклеточным, обеспечивая цитопротекцию за счет сворачивания белка, так и внеклеточным, способствующим иммунным ответам. Накопление белка 70 теплового шока связано с более высокой толерантностью к болезни. Известно, что они являются молекулярными шаперонами, но, похоже, также способны опосредовать гуморальные и клеточные врожденные иммунные реакции через Toll-подобные рецепторы [70].

Молекулы клеточной адгезии с синдромом Дауна представляют собой рецепторы, присутствующие у ракообразных и участвующие в нервном развитии. Они играют важную роль в нервной системе

и врожденной иммунной системе ракообразных. Предыдущее исследование с водяными блохами показало, что молекула молекул клеточной адгезии при синдроме Дауна представляет собой ген с одним локусом и обширным разнообразием. Молекулы адгезии клеток с синдромом Дауна могут продуцировать варианты со специфическими способностями связывания, в частности, для определенного иммунного заражения или инфекции. Эти многочисленные изоформы могут предложить возможное объяснение наблюдаемого феномена иммунного прайминга у ракообразных [71].

Маскарад подобный протеин обладает свойствами клеточной адгезии и может связывать грамотрицательные бактерии и стенки дрожжевых клеток, после чего маскарад-подобный протеин обрабатывается протеолитическим ферментом и играет решающую роль в качестве протеина врожденного иммунитета. Липополисахарид и β -1,3-глюкан-связывающий белок является рецептором распознавания образов для липополисахаридов и β -1,3-глюканов, причем последние присутствуют в грамотрицательных бактериях и грибах. Они считаются связанными с микроорганизмами молекулярными структурами. *Пероксинектин* — это белок клеточной адгезии, функционирующий как пероксидаза и опсонин. Образование пероксинектина активируется липополисахаридами и β -глюканами. Он активирует каскад пропенолоксидазы и приводит к фагоцитозу или инкапсуляции [72]. Внеклеточная супероксиддисмутаза играет важную роль в качестве механизма антиоксидантной защиты. Это фермент, который превращает супероксид в кислород и перекись водорода. Супероксид токсичен и вырабатывается фагоцитами для уничтожения патогенов. Мэн и его коллеги показали, что индукция экспрессии гена повышает устойчивость китайского миттенового краба к инфекции *Spiroplasma eriocheiris* [73].

Иммуностимуляторы в аквакультуре. Иммуностимуляторы – это вещества, стимулирующие иммунную систему. Они относятся к любому химическому или природному соединению, которое запускает неспецифическую систему защиты, чтобы сделать животных более устойчивыми к заражению вредоносным микроорганизмом [74]. В интенсивном выращивании креветок уже широко используются различные иммуностимуляторы. Среди различных видов иммуностимулирующих веществ β -глюканы оказались мощными, ценными и многообещающими соединениями для улучшения иммунного статуса водных организмов [75]

β -глюканы — один из наиболее часто используемых продуктов для иммуностимуляции в аквакультуре. Наиболее распространенным источником является клеточная стенка пекарских дрожжей, обеспечивающая как β -1,3-глюканы, так и β -1,6-глюканы. Тем не менее, доступны и другие источники β -глюканов, например, морские водоросли, грибы, такие как шиитаке, майтаке и шизофиллум коммуна. Разница между этими β -глюканами, полученными из других источников, и β -1,3/1,6-глюканами заключается в различиях в их структуре, которая запускает различные реакции врожденного иммунитета [76].

Известно, что β -глюканы запускают врожденную иммунную систему у ракообразных. Структурно β -глюканы представляют собой полисахариды, состоящие из остатка глюкозы, соединенного бета-связью. MacroGard является одним из наиболее известных иммуномодулирующих β -1,3/1,6-глюканов, полученных из специально отобранного штамма пивных дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. Он широко используется в иммунотерапии водных и наземных животных в течение почти 25 лет, а эффективность MacroGard в полевых условиях хорошо документирована [77].

У беспозвоночных β -глюканы вызывают два типа гуморальных ответов: коагуляцию и продукцию антимикробных пептидов.

В отличие от позвоночных, у которых растворимые и нерастворимые β -глюканы распознаются исключительно через ряд рецепторов клеточной поверхности, распознавание β -глюканов у беспозвоночных, по-видимому, происходит в основном в гемолимфе через ряд совершенно неродственных белков. β -глюканы распознаются у беспозвоночных рецепторами распознавания образов, такими как фактор G, Toll-подобные рецепторы и β -1,3-глюкан-связывающий белок. Это, в свою очередь, вызывает серию последовательных событий протеолиза, как упоминалось ранее. У индийских белых креветок, которых кормили морскими дрожжевыми клетками, глюканы значительно улучшали выживаемость против синдрома белых пятен, когда их вводили один раз в семь дней [78]. Исследования Marques et al. (2005) и Soltanian (2007) показали, что ежедневное добавление небольших количеств дрожжей и/или чистых глюканов обеспечивает *Artemia franciscana* защиту от *Vibrio campbellii* [79, 80].

§ 1.5. Применение цист Артемии

Использование в медицине. Цисты артемии содержат значительное количество таких веществ, как гормоны репродукции и роста, витамины, каротиноиды, которые играют важную роль в метаболизме высших животных и человека [81, 82]. Особо следует отметить обнаруженные артемии высокополиненасыщенные жирные кислоты — эйкозапентаеновую и докозагексаеновую [83], которые обладают биологической активностью. Установлено, что эти соединения с липидного обмена, снижают уровень холестерина в крови, а также служат предшественниками простагландинов.

В цисте артемии содержится значительное количество незаменимых аминокислот: лейцина, изолейцина, валина, фенилаланина, триптофана, треонина, лизина, метионина,

аргинина и гистидина. Недостаток одной или нескольких аминокислот в организме человека и животных может привести к таким тяжелым расстройствам, как задержка роста, развитие экземы, нарушение синтеза гемоглобина, а также к анемии, гипопроотеинемии, катаракте, некрозу печени. Приведенные данные свидетельствуют о том, что артемия и ее продукты могут быть с успехом использованы в фармакологической промышленности в качестве сырья для получения препаратов биологически активных соединений, витаминов, гормонов, восстанавливающих обмен веществ и способствующих нормальному росту и развитию организма человека и животных в случае возникновения у них патологических отклонений. [84].

Использование в косметологии. Дигуанозидтетрафосфат представляет собой симметричный бис-дифосфонуклеозид, который в больших концентрациях обнаруживается в цистах *Artemia*. Finamore и Warner показали, что после контакта цист *Artemia* с водой дигуанозидтетрафосфат ферментативно гидролизуетсЯ и увеличивает внутриклеточный АТФ примерно через 30 минут после регидратации [85, 86]. Небольшие скорости гидролиза дигуанозидтетрафосфат обеспечивают свободный поток энергии и позволяют инцистированным эмбрионам выживать в течение нескольких лет в непрерывных суровых условиях, включая непрерывную аноксию и гидролитический стресс [87]. Подобная молекула, которая широко встречается в клетках млекопитающих, диаденозинтетрафосфат, оказалась плейотипическим активатором, поскольку ее концентрация сильно коррелирует с тканевой активностью [88].

Было заявлено, что повышение внутриклеточной концентрации АТФ после гидролиза дигуанозидтетрафосфата вызывает стимулирующий эффект, который может быть полезен в применении в косметической промышленности, включая антивозрастные средства и восстановление кожи [89, 90].

Хотя дигуанозид тетрафосфат присутствует на рынке уже несколько лет, механизмы его действия неизвестны. Более того, нет опубликованных данных, показывающих, как дигуанозидтетрафосфат действует на компоненты кожи и его влияние на фолликулярный цикл [91].

Использование в аквариумистике и промышленном рыбоводстве. Считается, что аквакультура дополняет и, возможно, в конечном итоге заменяет чрезмерно эксплуатируемый рыбный промысел, удовлетворяя потребность растущего населения в высококачественных белках животного происхождения. В рамках этого сложного сценария устойчивая диверсификация методов аквакультуры становится сложной задачей. Потенциал для диверсификации огромен из-за разнообразия существующих водных видов, но узкое место в виде высокой смертности личинок угрожает реализации этого потенциала [92].

Одной из проблем, с которыми сталкивается выращивание личинок аквакультурных организмов в неволе, является количественное и качественное обеспечение цист морской креветки *Artemia*, аностраского ракообразного-жаброногого, естественные популяции которого распространены по всему миру в гиперсоленых внутренних озерах и прибрежных лагунах. Его только что вылупившиеся личинки науплиуса являются важным живым кормом на стадии гусеницы морских ракообразных и рыб. Это связано с его многочисленными преимуществами по сравнению с альтернативными живыми диетами на рынке, среди которых наиболее актуальными являются доступность и удобство сухих цист, которые можно хранить в пригодном состоянии на полке [93].

Цисты артемии являются торговой монетой в бизнесе морской аквакультуры и естественным образом собираются в ограниченном количестве соленых озер, основным местом производства которых является Большое Соленое озеро в штате Юта, США, но с растущим значением соленых озер,

разбросанных по России, Казахстану и Внутреннему Китаю. В сценарии изменения климата и увеличения нагрузки на урожай этих естественных соленых озер трудно управлять динамикой популяционных циклов артемии и, следовательно, прогнозировать средне- и долгосрочные сборы цист, даже в Большом Соленом озере, которое является хорошо управляемым и наблюдаемое озеро [94].

Использование Артемии в качестве корма для диких и сельскохозяйственных животных и птиц. В настоящее время используются интенсивные технологии выращивания животных, поэтому необходимо повышать требования к полноценному кормлению. Одной из главных проблем в повышении продуктивности и увеличении выхода продукции животноводства является дефицит кормового протеина. В Свердловской области нет производств собственной рыбной муки, поэтому недостаток полноценного белка является сдерживающим фактором в повышении продуктивности и увеличении уровня производства продукции животноводства [95]. В последние годы для того, чтобы укрепить кормовую базу и повысить продуктивное действие рационов стали использовать нетрадиционные корма и кормовые добавки. Нетрадиционные корма — это высокопитательный и биологически полноценный корм, который может превосходить лучшие виды мясокостной муки [96].

Нетрадиционные кормовые добавки дешевле, чем такие классические корма, как рыбная, мясокостная мука, соевый и подсолнечный жмыхи и шроты. Существует такая нетрадиционная кормовая добавка, как яйца *Artemia Salina*. Яйца данного рачка интересны тем, что имеют в своем составе до 60% протеина, до 15% жира и до 50 мг/л каротиноидов. В одном грамме сухих яиц 4,2-4,6 ккал обменной энергии. В состав яиц входят заменимые и незаменимые аминокислоты [97]. Применение яиц *Artemia Salina* в животноводческих хозяйствах показало хорошие результаты:

отмечались значительные приросты при вводе данной добавки в рацион молодняка крупного рогатого скота, свиней, птицы. Артемия благоприятно воздействует на организм животных, поэтому можно рекомендовать ее к промышленному производству [98].

Использование цист артемии позволяет создать широкий ассортимент БАД, продуктов функционального питания, а также, что особенно важно – перспективно применение цист артемии для повышения урожайности сельскохозяйственных культур, биологически-активных добавок для кормления животных, ветеринарных препаратов, удобрений, активаторов микробиологических процессов, парфюмерно-косметических средств, гигиенических средств.

В Китае выпускаются уникальные средства для кожи, где используется биоматериал артемии, а также препараты от импотенции. Известно, антипролиферативное средство на основе спиртового экстракта цист ракообразных, которое используется в медицине и косметологии (патент США). В настоящее время производится выпуск БАД «Артемия Голд» (патент Российской Федерации № 2550025 т 03.04.2015).

ГЛАВА 2. ВЫДЕЛЕНИЕ И ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА СОЕДИНЕНИЙ БЕЛКОВОЙ ПРИРОДЫ ЦИСТ АРТЕМИИ АРАЛЬСКОГО МОРЯ

Ценность артемии, используемой в качестве корма для рыб, крабов и креветок, выращиваемых в искусственных условиях аква- и марикультуры, зависит от ее химического состава. На его формирование влияют температура, соленость, содержание кислорода в среде и пище. В связи с этим расы артемии из различных природных источников имеют различный химический состав и, следовательно, разную кормовую ценность [99].

Известно, что при оценке кормовой ценности рачка особое значение имеют липиды, которые используются в качестве пластического и энергетического материала у культивируемых организмов. В цистах артемии содержится значительное количество липидов, однако их качественный состав неодинаков. Так, например, в яйцах рачков, обитающих в водоемах Италии, преобладают триацилглицерины, а в цистах из Большого Соленого озера (Юта, США) — фосфолипиды и стеролы. В онтогенезе состав липидов артемии может изменяться: содержание жирных кислот увеличивается в процессе развития рачка от 490-704мг/г-1 липидов в цистах до 602-854мг/г-1 липидов у науплиев [99, 100].

§ 2.1. Изучение общего химического состава цист *Artemia*

Корма - единственный поставщик протеина (из внешней среды) в организм животного. Для ликвидации дефицита белковых кормов перспективно использовать их нетрадиционные источники, в том числе биокорма водного происхождения, одним из представителей которых является артемия. Её химический состав зависит от места нахождения водоема, где обитает рачок и технологии ее обработки [154].

Проведено изучение общего химического состава (массовой доли влаги, массовой доли сухих, зольных и органических

веществ, массовая доля белка свободных аминокислот) и энергетического содержания цист артемии, собранных в Аральском море и в гипергалалинных озерах Павлодарской области Казахстана. [101] (таблица 2.1-2.4).

Сухое вещество определяли гравиметрическим методом, для этого пробы высушивали в сушильном шкафу в течение 2 часов при температуре 105оС. Золу получали сжиганием органических веществ в муфельной печи при температуре 500оС в течение 1 часа [102].

Таблица 2.1.

Органический состав цист Artemia

Пробы	Массовая доля влаги, %	Массовая доля сухих веществ, %	Массовая доля зольных веществ, %	Массовая доля органических веществ, %
Аральское море	76,18	23,82	9,75	14,07
озеро Ащытакыр	81,21	18,79	7,08	11,71
озеро Моилды	75,99	24,01	9,81	14,21
озеро Бура	79,45	20,55	7,70	12,85
озеро Маралды	81,42	18,58	7,51	11,07
озеро Сейитен	80,43	19,57	6,78	1,79
озеро Борлы	76,95	23,05	8,91	14,14

Содержание белка определяли биуретовым методом без минерализации проб в щелочном экстракте (таблица 2.2). Оптическую плотность растворов измеряли при длине волны 546 нм. Расчет вели по калибровочному графику, в качестве стандарта использовали бычий сывороточный альбумин.

Таблица 2.2.

**Массовая доля белка в рачках и цистах артемии в 100 г
сухого веса**

Пробы	Концентрация белка в 100 г сухой биомассы, г%	
	Рачки	цисты
Аральское море	81,60±0,31	49,20±0,36
озеро Ащытакыр	60,49±0,08	25,63±0,99
озеро Моилды	29,77±0,6	36,00±0,36
озеро Бура	44,88±0,16	43,56±0,09
озеро Маралды	38,20±0,55	37,03±0,09
озеро Сейитен	57,95±0,2	58,38±0,96
озеро Борлы	37,31±0,06	53,77±1,77

Количественное определение свободных аминокислот проводили на безбелковом экстракте методом ВЭЖХ. Предколоночную модификацию аминокислот проводили по методу Кохана (таблица 2.3) [103, 112].

Таблица 2.3.

**Содержание свободных аминокислот в рачках и цистах артемии
в 100 г сухого веса**

Пробы	Количество свободных аминокислот на 100 г сухого веса, мг	
	рачки	цисты
Аральское море	285,93±1,91	335,49±0,41
озеро Ащытакыр	97,57±1,18	39,48±0,28
озеро Моилды	73,58±0,21	39,49±0,13
озеро Бура	85,97±0,73	115,71±1,11
озеро Маралды	130,97±1,22	49,50±0,29
озеро Сейитен	226,54±3,37	95,53±0,73
озеро Борлы	75,20±0,73	50,72±0,32

Массовую долю липидов определяли экстракционно-весовым методом [104], используя бинарную смесь хлороформ: этанол (2:1). Определение количества общего сахара фенол-сернокислотным методом предусматривает построение калибровочной кривой по РСО глюкозы [141]. Расчетную энергетическую ценность продуктов питания (калорийность) определяли в соответствии [145] (таблица 2.4).

Таблица 2.4.

**Химический состав цист артемии и энергетическая ценность
в 100 г сухого веса**

Пробы	Белок	Липиды	Углеводы	Зола	Энергетическая ценность, ккал/100г
Аральское море	49,20±0,36	11,35 ±0,23	30,6±0,21	9,85	432,1
оз. Ащытакыр	25,63±0,99	8,74±0,35	53,6±0,34	7,08	406,5
оз. Моилды	36,00±0,36	4,10±0,27	45,09±0,2	9,81	371,4
оз. Бура	43,56±0,09	9,55±0,19	33,19±0,5	7,70	403,9
оз. Маралды	37,03±0,09	6,68±0,35	43,78±0,1	7,51	393,8
оз. Сейитен	58,38±0,96	10,84±0,45	24,05±0,4	6,78	435,4
оз. Борлы	53,77±1,77	8,13±0,36	29,19±0,3	8,91	416,5

Установлено, что цисты артемии из Аральского моря содержат значительные количества белка, углеводов и липидов, необходимых для роста, развития и созревания, культивируемых в искусственных условиях рыб и ракообразных и могут быть использованы в качестве эффективных стартовых кормов.

§ 2.2. Изучение органолептических и физико-химических показателей цист *Artemia* Аральского моря

Цисты артемии никогда не присутствуют и не добываются в «чистом виде». Первоначально собирается биомасса, содержащая цисты артемии [105]. Сбор происходит двумя способами:

- с водной поверхности: путем прокачивания насосами собираемой биомассы (в данном способе собираемая биомасса является наиболее чистой, так как содержит в основном только сам рачок артемии и цисты, с небольшим количеством водорослей и других примесей);

- с береговой полосы: путем неоднократной, поэтапной промывки и очистки собираемой биомассы, которая помимо цист артемии содержит в себе: песок, глину, ил, донные отложения, скорлупу цист от вылупившихся рачков артемии, водоросли, насекомые, перья и пух птиц и другие загрязнения, и примеси.

В настоящее время добывание цист артемии на Аральском море происходит только с береговой полосы, по причине того, что популяция Аральской артемии является молодой и еще только развивается, продолжает распространяться в водоеме и поэтому общая концентрация цист в толще воды является крайне низкой и не соответствует количествам, необходимым для добывания с водной поверхности [106].

Собираемая биомасса, помимо цист артемии содержит в себе много посторонних примесей. Предварительная подготовка для изучения образцов цисты артемии включает нескольких технологических этапов переработки биомассы: поэтапное выдерживание и промывку биомассы в насыщенных солевых рассолах (морской или соленой воде) и в пресной воде.

- посторонние тяжелые примеси удаляются по принципу отложения осадка в соленой воде, в которой полные цисты артемии вместе с посторонними легкими примесями всплывают на поверхность промывочного раствора, а посторонние тяжелые примеси осаждаются на дно;

- посторонние легкие примеси удаляются путем кратковременного выдерживания в пресной воде, в которой полные цисты артемии осаждаются на дно, а посторонние легкие примеси всплывают на поверхность и удаляются.

Первичную промывку биомассы проводили на береговых участках в специальных емкостях (промывочных баках), путем выдерживания и промывки биомассы в соленой морской воде, в целях удаления посторонних тяжелых примесей;

Основную переработку биомассы провели на перерабатывающих участках Муйнакской биостанции Каракалпакского отделения АН РУз, путем многократного выдерживания и промывки биомассы в пресной воде и в различных концентрациях ненасыщенных солевых рассолах, в целях удаления скорлупы цист артемии и других посторонних легких примесей, с последующим стеканием влаги из мешков с цистами в течение 12-24 часов и завершающим отжимом мешков с цистами на центрифуге;

Далее фасованные цисты в мешках привозили в г. Нукус и хранили в холодильнике при температуре не выше минус 50С .

Для проведения анализа была взята необходимая часть цист, которая просушивалась до воздушно сухого состояния, до влажности 10-15%.

Важнейшими параметрами качества цист артемии являются их размер (диаметр), процент вылупливаемости (количество науплиусов, которое может быть получено из 100 полноценных - содержащих в себе эмбрионы) цист. Пользующиеся наибольшим спросом на мировом рынке цисты имеют диаметр 220-230 мкм, в то время как коммерчески менее ценные цисты из Ирана имеют диаметр 260-287 мкм, из Китая - 233-280 мкм [107].

Вылупливаемость цист артемий является основным параметром, определяющим их коммерческую ценность, возможность сбыта их на мировом рынке аквакультуры.

В нормальных условиях из одного грамма яиц высокого качества вылупляется 200–300 тысяч науплиев. Идеальная всхожесть таких яиц – 95%.

Хорошего качества считаются цисты, вылупливаемость которых 70% и выше. Сбыт цист на мировом рынке, вылупливаемость

которых ниже 50%, затруднен и возможен лишь по сравнительно невысоким ценам [108].

Для определения важнейших характеристик цист рачка Артемии Аральского моря, собранного в конце марта и в начале апреля 2017г. была разработана программа необходимых исследований, определяющих полностью технические характеристики сырья, и которые далее могли нам послужить для целей сертификации ТУ [109].

Согласно Единой системе конструкторской документации (ГОСТ 2.114-97) для создания «Технических Условий» разработан предварительный документ стандартизации с включением основных, органолептических, технических, химических, физико-химических показателей цисты Артемии Аральского моря в следующем виде (таблица 2.5).

Сырые цисты Артемии А. моря по внешнему виду представляют собой однородную массу, состоящую из целых цист рачка *Artemia*, имеющих форму вогнутой полусферы со средним диаметром 236,3 мкм и примесей в виде пустотелых оболочек (скорлупы), и яиц с мертвыми эмбрионами (рисунок 2.1).

Запах цист рыбный, резко появляющийся с увлажнением, в сухом виде запах слабый специфический. Цвет цист зависит в основном от влажности, при влажности до 40-50% имеет темно-коричневую окраску, и осветляется до коричневого при меньшей влажности. Сырая циста первоначально имеет влажность 49,13%. Для анализа далее они просушиваются до воздушно сухого состояния, 10% влаги.

Количество пустых оболочек определяли двумя способами [117].

1. Определенное количество (200 шт) цист помещаем в цилиндр объемом в 1 литр, заполняем дистиллированной водой и пропускаем воздух для поддержания цист во взвешенном состоянии, в течение 1 ч. Затем отстаиваем 10-15 минут, полные цисты осаждаются на дно цилиндра, оболочки всплывают на поверхность воды. Отделяем фракции и вновь пересчитываем

их количество по отдельности.

Таблица 2.5.

Органолептические и физико-химические показатели цист

№	Наименование показателя	Характеристика и норма для цист рачка <i>Artemia</i>
1	Внешний вид	Сырая однородная масса, состоящая из целых цист рачка <i>Artemia</i> , имеющих форму вогнутой полусферы со средним диаметром 236,3мкм
2	Цвет	От коричневого до темно-коричневого
3	Запах	Рыбный. Свойственный доброкачественному сырью, без посторонних запахов.
4	Массовая доля влаги, %	49,13 (10-15% в воздушно-сухом состоянии)
5	Посторонние примеси, %	-
6	Количество пустых оболочек, %	14,0
7	Количество полных цист, %	80,0
8	Количество живых цист, %	74,0
9	Количество треснувших цист, %	6,0
10	Вылупляемость, %	74,0
11	Размер (диаметр цист), мкм	236,3 (от 220 до 260мкм)
12	Кол-во цист в 1 г. сух. массы, шт	220-230 тыс.
13	Белки, %	49,20
14	Жиры, %	13
15	Хитин, %	7,5
16	Хитозан, %	3,95
17	Зола, %	12,88
	Минеральные вещества:	
18	Са, %	0,45
19	Р, %	2,52

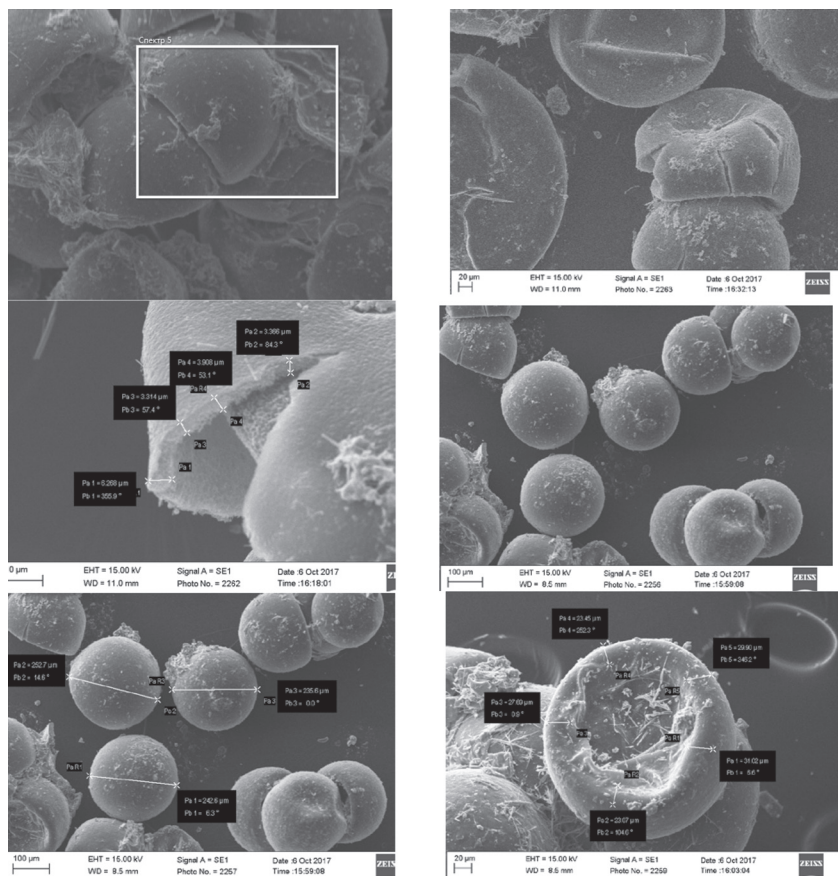


Рис. 2.1. Сканирующая микроскопия цист *Artemia salina* при
различном увеличении

2. Берем 200 цист и на их поверхность капаем 1 каплю перекись водорода, через 10 минут цисты вновь пересчитываем. В течение 10 минут оболочки цист под воздействием реагента растворяются.

Количество треснувших цист определяем под микроскопом, прокалывая иглой на присутствие или отсутствие эмбрионов.

Вылупляемость цист (или количество живых цист) определяем по проценту вылупляемости, в конусообразной емкости.

Таблица 2.6.

Вылупляемость цист во времени

Образец	Время инкуб.	Реагент	С	U	N	T	H-	H+
Циста, весна	24	0	61	53	158	272	58,0	77,5
	2017г.	0,6	43	32	127	202	62	78,1
		0,9	60	33	115	208	55,2	71,1
		1,2	82	33	64	179	35,7	54,1
	48	0	61	20	191	272	70,2	77,5
		0,6	43	14	145	202	71,7	78,1
		0,9	60	12	136	208	65,3	71,1
		1,2	52	13	148	203	72,9	79,3

Реагент- H₂O₂ активатор процесса; С – количество цист, U – количество эмбрионов; N – количество науплиев; Т – общее количество трех показателей; H- Процентный показатель вылупившихся науплиев; H+ - % показатель суммы науплиев и эмбрионов.

В V-емкость с раствором соли (28 г/л) содержащую 2-4 г цист (с учетом влажности), непрерывно подается воздух для поддержания взвешенного состояния цист, при освещении 1,5-2 люкс в течение 24 (48) часов.

Показатели вылупляемости по времени представлены в таблице 2.6 и 2.7.

Таблица 2.7.

№	Наименование	Проба 1	Проба 2	Проба 3	Среднее
1	Кол-во цист в пробе, шт	220	226	212	219,3
2	Вылупляемость, %	80,0	76,5	68,9	75,13
3	Не проклюнувшиеся цисты, %	13,6	17,7	24,9	18,73

Опыты показали, что вылупляемость цист (в среднем 75,13%) соответствует их хорошему качеству.

Размер цист (диаметр). Цисты, были измерены под микроскопом с помощью окуляр-микрометра. Всего было проверено 100 цист из 5 проб (по 20 цист из каждой пробы). Средний диаметр цист составил 236,3 мкм при вариабильности от 220 до 257,2 мкм. Таким образом, размер цист Аральской артемии является близким к коммерчески оптимальному (наибольшим спросом пользуются цисты диаметром менее 250 мкм). Пользующиеся наибольшим спросом на мировом рынке цисты имеют диаметр 220-230 мкм.

Массовая доля влаги. Массовая доля гигроскопической влаги в сырье была определена путем высушивания образцов при 100-1050С в течение 3 ч. до постоянной массы (и согласно требованиям [110]).

Массовая доля белка в сырье – по методу Кьельдаля [111].

Массовую долю жира определили экстракционным методом в Сокслете по обезжиренному остатку по [106]. Состав незаменимых жирных кислот определен методом ГХ [140].

Массовая доля минеральных веществ была определена сжиганием органических веществ сначала прожигается органических часть в пламени, в муфельной печи при температуре 500-7000С в течение 5-6 часов до постоянной массы по [106].

Определение кальция и фосфора провели по [114]. (Метод определения содержания фосфора).

При определении общей золы в качестве образца цист были взяты — сырая циста и помытая (обессоленная) циста. Опыты были проведены в 6 вариантах. Среднее содержание золы для сырой цисты 12,88 % при вариабельности 11,31 – 14,02%. Для обессоленной цисты среднее значение общей золы – 4,36%, при вариабельности 3,7 – 5,04%. Количественное содержание кальция в среднем составило 0,45%, фосфора – 2,523%.

§ 2.3. Определение органических компонентов (белка, жира, хитина и хитозана)

Химический состав цист артемии по предварительным данным характеризуется очень высоким содержанием протеина (до 53,14%), содержание липидов в среднем составляет до 13,96%, количество хитина около 9,17% (таблица 2.8).

Были взяты образцы цисты, скорлупы цисты, измельченные образцы цисты и скорлупы цисты.

Таблица 2.8.

Химический состав цист артемии *Artemia*

№	Наименование	Общий азот, %	Протеин, %	Липиды, %	Хитин, %
1	Скорлупа цисты	2,82	17,62		9,55
2	Циста	7,27	45,51	3,69	8,86
3	Из. скорлупа	4,51	28,18	7,99	11,78
4	Измельченная циста	8,51	53,18	13,96	9,17

Минеральные вещества наряду с белками, жирами, углеводами и витаминами являются жизненно важными компонентами пищи человека, необходимыми для построения структур живых тканей и осуществления биохимических и физиологических процессов, лежащих в основе жизнедеятельности любого организма. Кроме того, элементный состав природных объектов может также отражать воздействие окружающей среды и определять уровень их экологической чистоты, способности накапливать токсические элементы, для оценки качества и безопасности применения в качестве биопродуктов [115].

Количественное определение микро- и макроэлементов проводили с помощью метода масс-спектрометрии с индуктивно связанной плазмой (ИСП-МС), позволяющей одновременно определять до 50 элементов с низкими пределами обнаружения и широким диапазоном концентрации в рамках одного измерения.

Изучение элементного состава цисты артемии и его золы показало наличие 29 элементов [116]. Анализ исследуемого вещества проводили на приборе – масс-спектрометрии с индуктивно связанной плазмой (ИСП МС).

Таблица 2.9.

**Количество макро- и микроэлементов цисты *Artemia A.* моря
($M \pm n$, $n=3$)**

	Наименование Показателей	Фактически, мг/кг	
		Цисты, мука	Цисты, зола
Микроэлементы			
1	(Ca)	2081,02±17,71	25607,7±150,6
2	(K)	5438,05±23,58	67219,1±540,8
3	(Mg)	1739,51±15,72	12025,1±98,35
4	(Na)	870,393±8,523	9552,22±83,23
5	(P)	8560,612±45,31	92579,1±850,1
6	(Si)	0,89125±0,015	12,721±0,985
Микроэлементы			
1	(Al)	153,601±1,573	2364,71±20,87
2	(As)	1,45395±0,095	11,1481±0,871
3	(Ag)	0,152687±0,009	1,01935±0,085
4	(Ba)	6,50094±0,081	21,4876±0,752
5	(Be)	0,016988±0,005	0,8912±0,0012
6	(Bi)	0,957058±0,025	13,2913±0,231
7	(Cd)	0,011798±0,0057	0,6815±0,0075
8	(Co)	0,980075±0,017	10,6473±0,812
9	(Cr)	2,83083±0,025	24,6677±0,271
10	(Cs)	2,51530±0,075	22,2596±0,238
11	(Cu)	7,46502±0,015	74,807±0,751
12	(Fe)	646,810±5,125	8491,3±54,23
13	(Ga)	0,09812±0,0012	1,2794±0,0014
14	(Li)	0,574831±0,085	1,9486±0,024

15	(Mn)	11,2307±0,981	117,633±1,124
16	(Ni)	3,64529±0,0152	35,7078±0,214
17	(Pb)	0,631838±0,0042	5,80466±0,035
18	(Rb)	3,40011±0,0025	35,2015±0,234
19	(Se)	14,6589±0,891	90,0198±0,871
20	(Sr)	39,7572±0,621	324,035±3,152
21	(Tl)	8,29429±0,0125	85,2571±0,974
22	(V)	2,65396±0,048	25,1544±0,189
23	(Zn)	110,989±1,891	1296,08±10,85

Свободные аминокислоты определяли методом ВЭЖХ. Предколонную модификацию аминокислот проводили по методу Кохана [112].

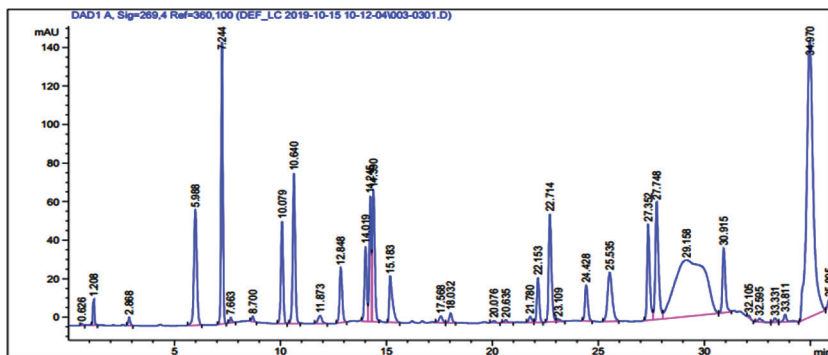


Рис. 2.2. Хроматограмма смеси производных аминокислот ФТК.

Таблица 2.10.

Состав свободных аминокислот цисты Артемии в зависимости от сезона сбора

№	Аминокислоты	Количество (мг/г)	
		Июнь	Ноябрь
Заменимые аминокислоты			
1	Аспарагиновая к-та	0,124292	0,132786
2	Глутаминовая к-та	0,536685	0,637681
3	Серин	0,130872	0,146253
4	Глицин	0,167877	0,159497
5	Аспарагин	0,168248	0,161272
6	Глутамин	1,21545	1,089977
7	Цистеин	-	-
8	Аланин	0,237065	0,239518
9	Пролин	0,180859	0,093159
10	Тирозин	0,237407	0,107743
Незаменимые аминокислоты			
1	Треонин	0,130518	0,125114
2	Аргенин	0,198962	0,222318
3	Валин	0,02078	0,017903
4	Метионин	0,032592	0,031633
5	Изолейцин	0,063059	0,072898
6	Лейцин	0,134507	0,098944
7	Гистидин	-	-
8	Триптофан	0,019257	0,01238
9	Фенилаланин	0,012987	0,010668
10	Лизин HCl	0,009684	0,005165

Белки экстрагировали из обезжиренной муки в буфер (Tris-HCl 0.5 M), в течение 2 ч (3 раза), при комнатной температуре. По окончании экстракции, образцы центрифугировали в течение

15 минут при 6000 об/мин. Далее отбирали супернатант, который лиофильно высушивали [113].

Таблица 2.11.

Состав аминокислот белковой фракции цисты Артемии

№	Аминокислота	Цисты, мг/г	%	оз. Урмия цисты А. %
Заменимые аминокислоты				
1	Asx	54.13995	14.62	42,2
2	Glx	76.94145	20.63	58,8
3	Ser	16.00963	4.38	18,9
4	Gly	11.81316	3.23	22,3
5	Cys	19.00784	5.20	4,9
6	Ala	18.25586	4.99	31,0
7	Pro	15.23593	4.16	-
8	Tyr	17.29176	4.73	-
	Сумма	228,8944	62,88	178.1
Незаменимые аминокислоты				
1	Thr	11.6639	3.19	19,9
2	Arg	17.48705	4.78	26,1
3	Val	29.19847	7.99	25,8
4	Met	2.897253	0.79	8,8
5	Ile	29.52861	8.08	22,7
6	Leu	33.55143	9.18	38,8
7	His	9.02572	2.47	10,8
8	Trp	-	-	-
9	Phe	1.720675	0.47	24,9
10	Lys HCl	1.383373	0.37	29,4
	Сумма	136,4561	37,12	207.2
	Итого	365,3505	100	385.3

Водорастворимые витамины определяли методом ВЭЖХ [118] в обращенно-фазовом, ион-парном варианте, в изократическом режиме со СФ детектированием.

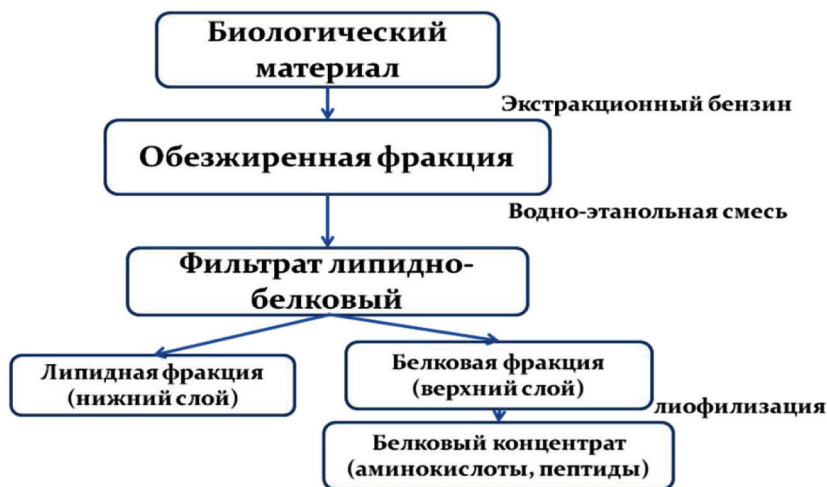
Таблица 2.12.

Количество водорастворимых витаминов цисты Артемии, мг/кг ($M \pm n$, $n=3$)

	B1	B2	PP	B6	C
Цисты, порошок	12,25 $\pm$ 0,7	27,42 $\pm$ 0,8	150,7 $\pm$ 0,1	18,40 $\pm$ 0,3	425,2 $\pm$ 0,5

§ 2.4. Получение липидной и белково-пептидной фракций цист *Artemia*

Для разделения и выделения белково-пептидной и липидной фракций разработана следующая схема:



Полученный фильтрат после экстрагирования в течение 1-2 часов отстаивали до полного формирования двух слоев жидкостей. Нижний слой представляет собой комплекс липидов,

легкоплавкий (t плавления 50°C). Выход 3,7% от сухого веса сырья.

Верхний водно-спиртовой слой сливают в выпарной аппарат и удаляют спирт в вакууме. При необходимости полученный раствор сушат, остаток представляет собой порошок кремового цвета, включающий концентрат аминокислот и пептидов. Кроме того, этот продукт содержит небольшое количество углеводов, фосфолипидов. Выход 7,0% от сухого веса сырья.

Определяли количественное содержание белка по методу Лоури. Калибровочную кривую строили по бычьему сывороточному альбумину.

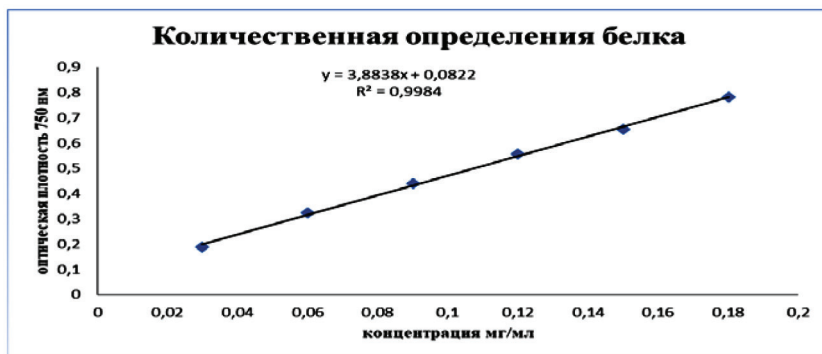


Рис. 2.3. Калибровочная кривая по альбумину
на 20 г сухого вещества содержание белка составило 3,66 %..

§ 2.4.1. Подбор экстрагента для получения липидной фракции

Для получения липидной фракции брали 100 г порошка цисты, экстрагировали различными растворителями: бензином, гексаном, хлороформом в объемном соотношении 1:5 (сырье: растворитель) при комнатной температуре и перемешивании в течение 4 часа (6-7кратно). Затем массу фильтровали через фильтровальную бумагу и растворитель упаривали на ротаторном испарителе.

Таблица 2.13.

Содержание жиров в растворителе после обезжиривания цист

	Бензин	Гексан	Хлороформ
Цисты, порошок	12.6%	11.35%	13.16%

Содержание жира в цистах артемии Аральского моря находится в пределах 11,35-13,16%. Наиболее оптимальным растворителем при обезжиривании цист является хлороформ.

В полученной липидной фракции проводили определение массовой доли метиловых эфиров индивидуальных жирных кислот к их сумме методом газовой хроматографии [140].

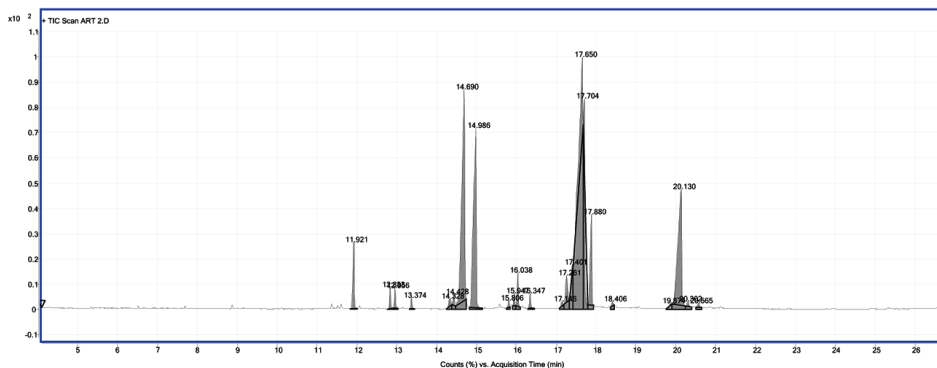
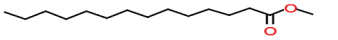
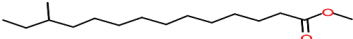
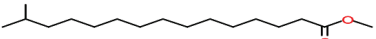
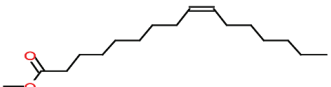
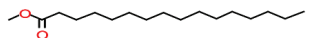
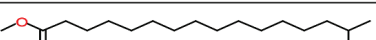
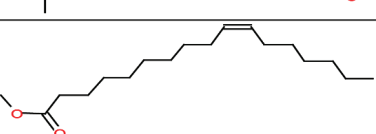
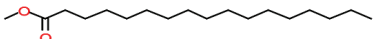
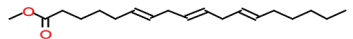
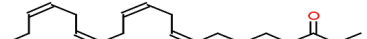
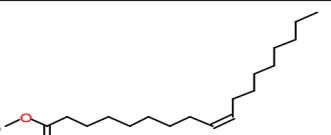
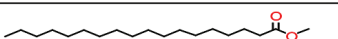
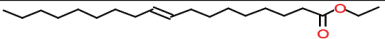
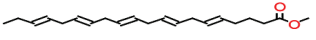


Рис. 2.4. Жирнокислотный состав методом ГХ

Газохроматографические исследования выявили наличие мононенасыщенных и полиненасыщенных жирных кислот в жире цист артемии (Таблица 2.14).

Таблица 2.14.

Состав жирных кислот цист *Artemia* Аральское моря.

	Миристиновая кислота, метиловый эфир	$C_{15}H_{30}O_2$
	Пентадекановая кислота, метиловый эфир	$C_{16}H_{32}O_2$
	Тетрадекановая кислота, 12-метил-, метиловый эфир	$C_{16}H_{32}O_2$
	Пентадекановая кислота, 14-метил-, метиловый эфир	$C_{17}H_{34}O_2$
	9-гексадеценовая кислота, метиловый эфир, (Z) -	$C_{17}H_{32}O_2$
	Гексадекановая кислота, метиловый эфир	$C_{17}H_{34}O_2$
	Гексадекановая кислота, 15-метил-, метиловый эфир	$C_{18}H_{36}O_2$
	Гексадекановая кислота, 14-метил-, метиловый эфир	$C_{18}H_{36}O_2$
	цис-10-гептадеценовая кислота, метиловый эфир	$C_{18}H_{34}O_2$
	Гептадекановая кислота, метиловый эфир	$C_{18}H_{36}O_2$
	метиловый эфир, 6,9,12- октадекатриеновая кислота	$C_{19}H_{32}O_2$
	Метил стеаридонат	$C_{19}H_{30}O_2$
	метиловый эфир 9-октадеценовая кислота (Z) -	$C_{19}H_{36}O_2$
	Метил стеарат	$C_{19}H_{38}O_2$
	Этил (9Z) -9-октадеценоат	$C_{20}H_{38}O_2$
	Метил эйкоса-5,8,11,14,17- пентаеноат	$C_{21}H_{32}O_2$

§ 2.4.2. Выделение белков и их очистка

Цисты, после обезжиривания хлороформом, последовательно экстрагировали 0.1М HCl, 0.1М H_3PO_4 , 10% CH_3COOH в объемном соотношении 1:5 (сырье : растворитель) при комнатной температуре и перемешивании в течение 2 часа (3кратно). Экстракты фильтровали и осаждали ацетоном (1:5), хранили в холодильнике при 4°C в течение суток. Осадок отделяли центрифугируем (6000 об/мин) при 4°C, выделяемую сумму сушили при комнатной температуре и количество белка определяли методом Лоури.

Таблица 2.15.

Количество белка, мг/мл

0.1 м HCl	0.1м H_3PO_4	10% CH_3COOH
0.84мг/мл	1.26мг/мл	0.81мг/мл

Для дальнейших разделений, сумму белков экстрагировали 0,1 М H_3PO_4 и проводили разделение методом гель-хроматографии. Использовали в качестве сорбента TSK-55. В качестве буферного раствора использовали:

➤ 0.1% H_3PO_4 .

При гель-хроматографии белкового экстракта, элюируемого буфером 0.1% H_3PO_4 получено 2 фракции. При электрофоретическом изучении не обнаружено белковых пятен.

➤ 0.1% CH_3COOH

При гель-хроматографии белкового экстракта, элюируемого буфером 0.1% CH_3COOH получено 3 фракции (Рис. 2.6.).

➤ 0.1% H_3PO_4 .

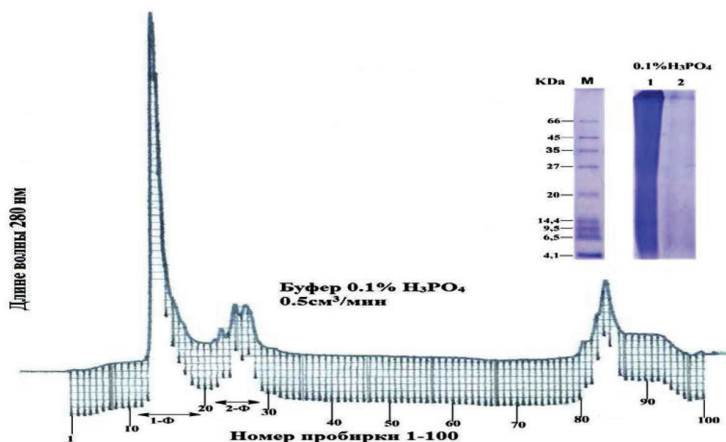


Рис. 2.5. Гель хроматография белкового экстракта, (сорбент TSK-55 (16 мм•200 мм). Буфер элюции 0,1М H_3PO_4 , pH 7,8. Скорость потока 0,5 мл/мин, длина волны 280 нм). и электрофорез собранных фракций.

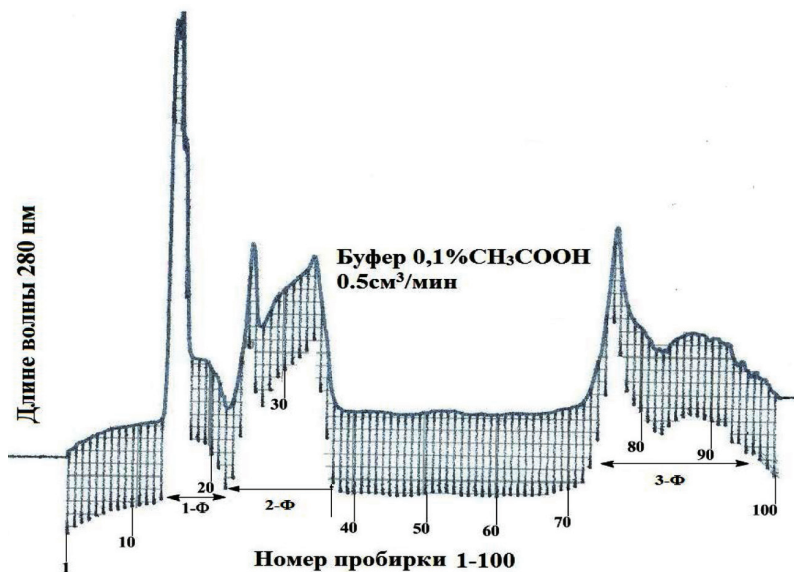


Рис. 2.6. Гель хроматография белкового экстракта (сорбент TSK-55 (16 мм•200 мм). Буфер элюции 0,1% CH_3COOH , pH 7,8. Скорость потока 0,5 мл/мин, длина волны 280 нм).

§ 2.4.2.1. Идентификация белков и пептидов из цисты Артемии

Метод масс-спектрометрического картирования пептидов в сочетании с доступными программами для анализа полученных данных в режиме on-line (MASCOT, Aldente, FindPept, FindMod, GlycoMod) позволяет быстро и надежно идентифицировать как индивидуальные соединения, так и во многих случаях отдельные компоненты препаратов, не прибегая к их очистке.

Первичная структура белков была исследована масс-спектрометрическим методом. Для этого соответствующую часть электрофорезного геля (рис. 2.7, дорожка 5 и 6) отсекали и цистеиновые связи в белках восстанавливали до сульфгидрильных групп с использованием дитиотреитола и гидролизовали трипсином с карбоксиметилированием йодацетамидом. Пептиды извлекали 0,1% ТФУ. Извлеченные пептиды из образца анализировали на масс-спектрометре Agilent Technologies CHIP-LC-MS Q-TOF 6520V. Полученные масс-спектрограммы анализировали с использованием баз данных масс-спектров

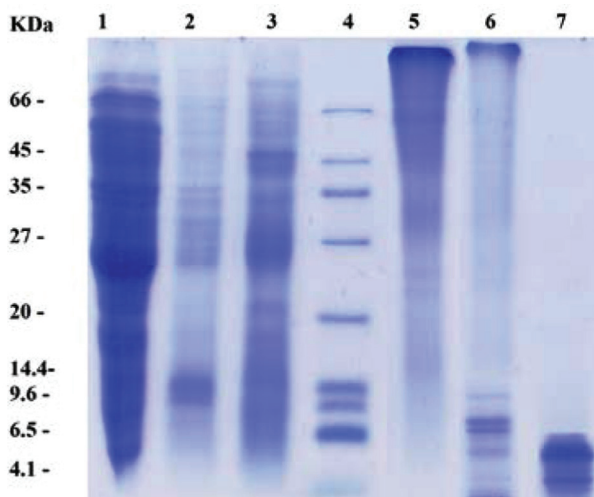


Рис. 2.7. Гель-электрофорез 1. Экс. пол. 0.1М H_3PO_4 2. Экс. пол. 0.1М HCl 3. Экс. пол. 10% CH_3COOH 4. Маркеры, 5. Фрак. 1, 6. Фрак. 2, 7. Фрак. 3

Spectrum Mill и MassCot. В результате были идентифицированы аминокислотные последовательности фрагментарных пептидов для каждого пятна.

Для фракции 2 было идентифицировано 13 фрагментарных пептидов.

Таблица 2.16

Последовательность фрагментов триптического гидролизата

Аминокислотная последовательность фрагментарных пептидов		ММ
1	RAVPMPEGLPEDIDKGEVNPRD	2163,076
2	KSYELPDGQVITIGNERF	1790,892
3	RLGVEGLLKM	828,519
4	KIGGIGTVPVGRV	1025,611
5	KYIQATDASEAAAEAVEEKL	1895,887
6	KGILAADESTATIGKR	1346,717
7	RIVPIVEPEVLPDGDHDLDR	2128,093
8	KTITLEVEPSDTIENVKA	1787,928
9	KSYELPDGQVITIGNERF	1790,892
10	KTITLEVEPSDTIENVKA	1787,928
11	RKGEQDIPGITDVTVPKR	1696,912
12	KIAGLEVLRIINEPTAAALAFGLDKVKK	2722,587
13	RSGEEIPEWF AFKSVVDVLR	2208,134
Всего 241 аминокислот		23173,176

Исследования показали, что первичная структура изучаемого белка, составленная из триптических гидролизатных пептидов, содержит 241 аминокислот.

RAVPMPEGLPEDIDKGEVNPRDKSYELPDGQVITIGNERFR
LGVEGLLKMKIGGIGTVPVGRVKYIQATDASEAAAEAVEEKL
KGILAADESTATIGKRRIVPIVEPEVLPDGDHDLDR
AKTITILEVEPSDTIENVKAKSYELPDGQVITIGNERFK
TITILEVEPSDTIENVKARKGEQDIPGITDVTVPKR
KIAGLEVLRIINEPTAAALAFGLDKVKK
RSGEEIPEWF AFKSVVDVLR

Идентифицированная аминокислотная последовательность была изучена в базе данных NCBI. Исследования показали, что первичная структура данного белка частично гомологична убиквитиноподобным белкам (Ubls), которые представляют собой семейство высококонсервативных белков, имеющих сходство не только по структуре, но и по способу действия.

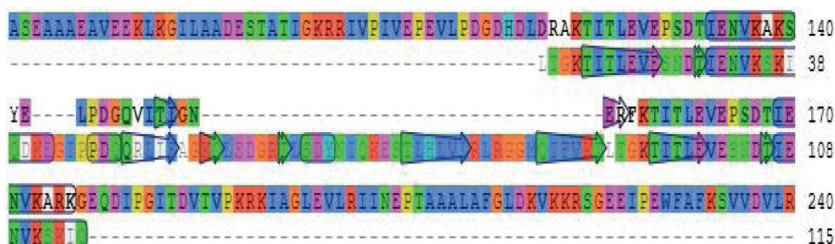


Рис. 2.8. Частичная аминокислотная гомологичная последовательность белка *Polyubiquitin Artemia*, соответствующая *Polyubiquitin*.

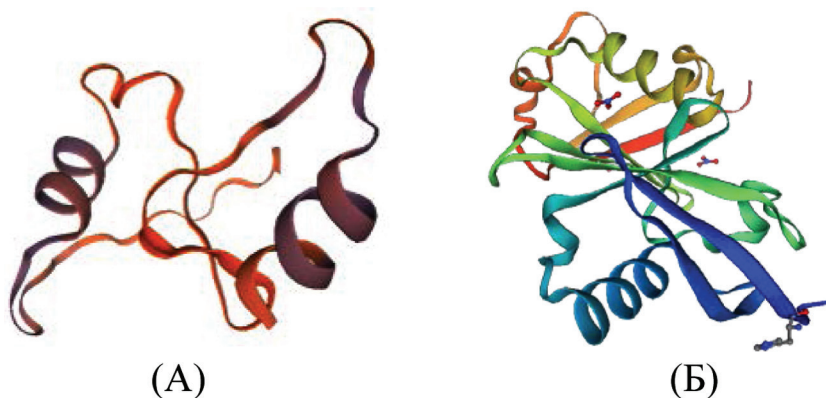


Рис.2.9. Трехмерная структура. (А) *Polyubiquitin Artemia parthenogenetica*; (Б) *Polyubiquitin*

Убиквитиноподобные белки регулируют множество биологических процессов, от протеолиза до устойчивости к повреждению ДНК. Функциональная гибкость этой посттрансляционной модификации коренится в существовании большого количества убиквитирующих ферментов, катализирующих образование отдельных полимеров убиквитина, которые, в свою очередь, кодируют разные сигналы.

Три класса ферментов опосредуют ковалентное связывание убиквитина, белка из 76 аминокислот, с белками-мишенями: фермент, активирующий убиквитин E1, активирует убиквитин для переноса на фермент, конъюгирующий с убиквитином E2, который, в свою очередь, взаимодействует с убиквитин-лигазой E3 для переноса убиквитина остатков лизина на целевом белке [119]. Этот ферментативный каскад может также переносить убиквитин на остатки лизина самого убиквитина, тем самым генерируя цепи полиубиквитина на целевых белках [119].

Убиквитин имеет семь акцепторных лизинов (K6, K11, K27, K29, K33, K48 и K63), все из которых используются *in vivo* для генерации полиубиквитиновых цепей [120].

Для фракции 3 с использованием программы Spectrum Mill были определены их аминокислотные последовательности и сопоставимы с масс-спектрами белков, присутствующих в базе данных программы. В результате были идентифицированы первичные структуры 90 фрагментарных пептидов (табл.2.17), которые были проанализированы в базе данных NCBI.

Таблица 2.17

**Структуры фрагментарных пептидов, полученных из цисты
Артемии**

Sequence	MH+	Sequence	MH+
	(Da)		(Da)
(R)AVPMPEGLPEDIDKGEVNPR(D)	2163,076	(R)IEPSPDEVKMFAPFHSLEHFNER(E)	2827,351
(K)SYELPDGQVITIGNER(F)	1790,892	(R)LAGLELVDRLAGLEPK(V)	1693,985

(R)GIVGEIHK(F)	984,621	(R)INIPGIK(L)	754,483
(K)EIEIDIEPTDKVER(I)	1685,86	(K)GSEELISDRLAHR(S)	1482,767
(R)LGVEGLLK(M)	828,519	(R)VSIGTQEEMNK(F)	1235,594
(K)IGGIGTVPVGR(V)	1025,611	(K)VIPEKWHIEPRTVIDDCAEAK(K)	2449,255
(K)YIQAATDASEAAAEAVEEK(L)	1895,887	(K)DLEDLSYYK(D)	1145,537
(R)TGAIVDVPIGDELLGR(V)	1624,891	(K)VEEPQAPSAAHDLFAD(-)	1696,782
(K)GILAADESTATIGK(R)	1346,717	(R)SGEEIPEWFAFKSVVDVLR(A)	2208,134
(R)IVPIVEPEVLPDGDHDLDR(A)	2128,093	(R)NLFVVQGWDIERK(Q)	1603,86
(K)ITILEVEPSDTIENVK(A)	1787,928	(K)VTINRPEVR(N)	1083,628
(K)CILDIPILFSEKCK(L)	1621,87	(K)EVTLPMEIFGR(G)	1404,756
(K)LEIGGDLVGSYDPIQK(K)	1816,97	(K)LVLAPSPVIDAK(L)	1222,741
(R)FPRACVDSPEASTHQVK(L)	1958,939	(R)RDDIFRSFEFVVETALK(D)	2072,082
(K)TVSDVSRWASSERNTEPVTILTK(H)	2576,332	(R)EAQVKLQUESTSGSPMTK(Q)	1917,959
(R)TVIINKDLSAYTGSVDENGVPQK(V)	2448,262	(R)IAVISFHSAEDR(I)	1344,691
(K)IDEGVLVTWTK(R)	1260,684	(R)IATEALDALPPEEAAR(Q)	1666,865
(R)KGVNLPGTPVDLPAVSEK(D)	1821,012	(R)TQMHGRGHQDTRR(G)	1579,762
(K)LVPETEEVEAK(T)	1243,642	(R)LTRQVPR(I)	869,532
(K)EETVTILLYAARDENYNHVVVLK(K)	2576,336	(R)EEADIPIQRVR(F)	1325,718
(R)LGLSTGGAQGPEPSLNR(T)	1653,856	(R)LEGEDTLAPAPSGR(M)	1412,702
(K)QGAADAQVELGYGHMDNYMR(L)	2225,971	(R)LESGEGRGAGPGGRR(G)	1455,742
(R)QSLRVLGNDSAFELSQR(Q)	2034,037	(R)EVQTTGGVDIDEGLEDFFPEELPF(-)	2661,21
(K)SYELPDGQVITIGNER(F)	1790,892	(R)VIWESIAYLER(G)	1491,821
(K)ISNIAAPDEAPAAGGVATTLAKDDLPIK(E)	2832,536	(K)KSNNEEDGAEQPKK(K)	1573,746
(K)ITILEVEPSDTIENVK(A)	1787,928	(K)SCFKLLSSLCMEGEYDK(A)	1952,881
(R)SRFENMARTAEENK(Q)	1811,835	(K)EFFSGLEVADAVIDK(E)	1639,822
(R)ATVEPVLQNK(G)	1213,643	(R)ELASAINPNVVTADGR(V)	1627,829
(R)VPLVPAMITGRK(R)	1281,772	(-)MAMNRRTHGVEQDSITGAFK(D)	2249,092
(K)LPEEPRPIGKYGRMHR(E)	1936,034	(R)KGEQDIPGITDVTVPK(R)	1696,912
(K)VREHGFIKSHMDLAK(A)	1767,933	(K)TTDRPSLIEVK(T)	1258,701
(R)LGELTRNNTK(C)	1145,628	(R)VSEVPVSPLSRAK(V)	1368,785
(R)ALHTFSLSPDHR(I)	1493,786	(R)LDDIEQNLRVLR(T)	1370,739
(R)LQPFLPDVR(L)	1084,616	(R)GTDSFEGCRLTVK(V)	1412,684
(R)EEEAYYEEIEKSTVTSPEVK(S)	2360,103	(R)TVGMNPWKKEIAKATNPEK(F)	2143,086
(K)VAQEYDLNSIQK(E)	1407,712	(K)IAGLEVLRIINEPTAAALAFGLDKVK(K)	2722,587

(K)ELEGLPWLGDMQK(G)	1515,752	(K)QGKDATIVSFGIGMTYAVK(A)	1986,037
(K)IRGVTCLFWYK(M)	1456,777	(K)DKTTEPFGEGLHAQTAR(W)	1958,957
(K)LGADVPCIESR(T)	1230,615	(K)ISVEPVEAISGGGAR(N)	1441,765
(R)LEEGSPAGR(K)	915,454	(R)VVTLGTSGTSGEPK(R)	1332,701
(K)QYELIYSDINPK(Y)	1482,748	(K)CILDIPILFSEKCK(L)	1621,87
(R)LGAGAVRDWLQTTK(D)	1644,871	(R)YELIDPIGR(G)	1075,579
(K)LNVDKSDIRPTIGMEDPWYYRNK(S)	2810,394	(R)DNALDFLTMSYNEVKNK(L)	2001,959
(R)EVANTLDIRSR(A)	1360,718	(R)LYFANHAEVSIASQTK(Q)	1907,95
(R)EAGEGSNFGPFGQRR(I)	1737,795	(K)ETAAPTAEAIQKLRTEDLLVK(K)	2497,388

Таблица 2.18.

Фрагментарные пептиды, идентифицированные в базе данных NCBI

№	Аминокислотная последовательность, определенная масс-спектральным анализом	Индекс совмест.	Название белков/ аннотация NCBI
1	RAVPMPEGLPEDIDKGEVNPRD	100%	Elongation factor-2 [Artemia salina]
2	KSYELPDGQVITIGNERF	100%	Actin [Artemia sp.]
3	KGILAADESTATIGKR	100%	Fructose 1,6-bisphosphate aldolase [artemia franciscana]
4	RIVPIVEPEVLPGDHDLDRA	90%	Fructose 1,6-bisphosphate aldolase [artemia franciscana]
5	KTITLEVEPSDTIENVKA	100%	Ubiquitin unit IV [artemia franciscana]
6	KSYELPDGQVITIGNERF	100%	Beta-actin [artemia franciscana]
7	KTITLEVEPSDTIENVKA	100%	ubiquitin unit IV [artemia franciscana]
8	RKGEQDIPGITDVTVPKR	100%	Ribosomal protein s6 [artemia franciscana]
9	KIAGLEVLRIINEPTAAALAFGLDKVKK	92%	Heat shock protein 70 [artemia urmiana]

10	RLGVEGLLKM	90%	NADH dehydrogenase subunit 5 [Artemia sinica]
11	KIGGIGTVPVGRV	100%	Elongation factor 1-alpha [Artemia salina]
12	KYIQATDASEAAAEAVEEKL	100%	Actin-depolymerizing factor [Artemia franciscana]
13	RSGEIPEWF AFKSVVDVLR A	93%	Dicer-1 [Artemia franciscana]

Elongation factor-2. Участок, идентифицированный в Артемии Аральского моря, гомологичен участку elongation factor-2 Artemia salina (рис.2.10).

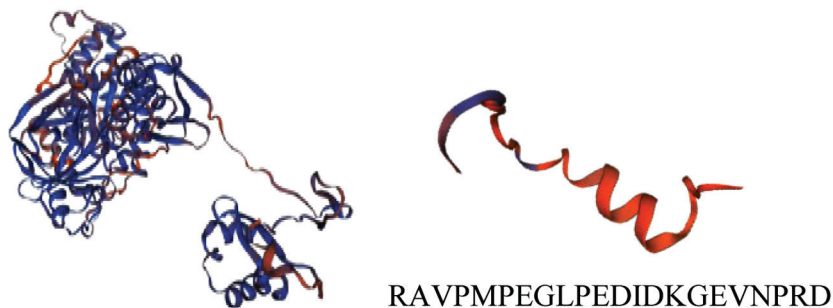


Рис.2.10. Трехмерная структура участка Фактор элонгации 2 Артемии Аральского моря в сравнении с Фактор элонгации 2 Artemia salina.

Инцистированные зародыши Artemia salina содержат ингибитор синтеза белка, который важен для контроля трансляции и играет центральную роль в регуляции синтеза белка на раннем этапе развития артемии.

Actin. Два участка, идентифицированные в Артемии Аральского моря, гомологичны участкам изоформ актина Artemia franciscana (рис.2.11).

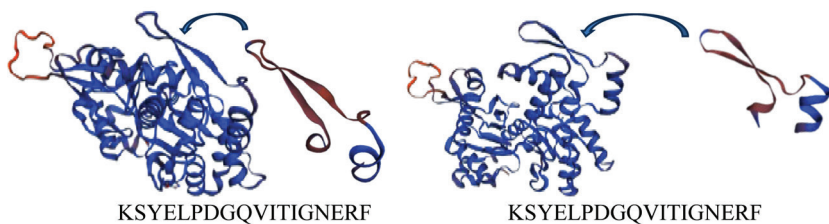


Рис.2.11. Трехмерная структура участков актина Артемии Аральского моря в сравнении с изоформами актина *Artemia franciscana*.

Актины – это высококонсервативные белки, которые участвуют в различных типах подвижности клеток и повсеместно экспрессируются во всех эукариотических клетках. Во время развития артемии экспрессируются по крайней мере 4 изоформы актина. Множественные изоформы участвуют в различных клеточных функциях, таких как структура цитоскелета, подвижность клеток, движение хромосом и сокращение мышц.

Fructose 1,6-bisphosphate aldolase Два участка, идентифицированные в Артемии Аральского моря, гомологичны участкам fructose 1,6-bisphosphate aldolase *Artemia franciscana* (рис.2.12).

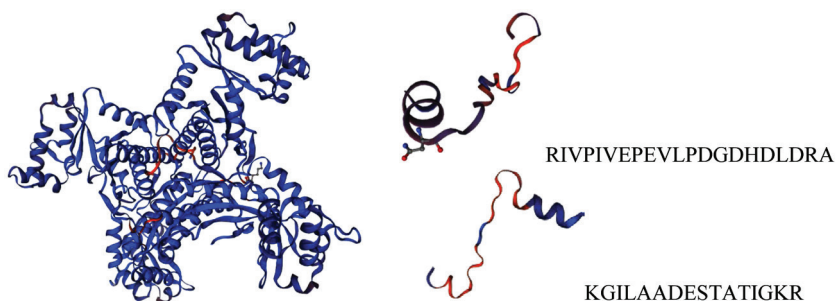
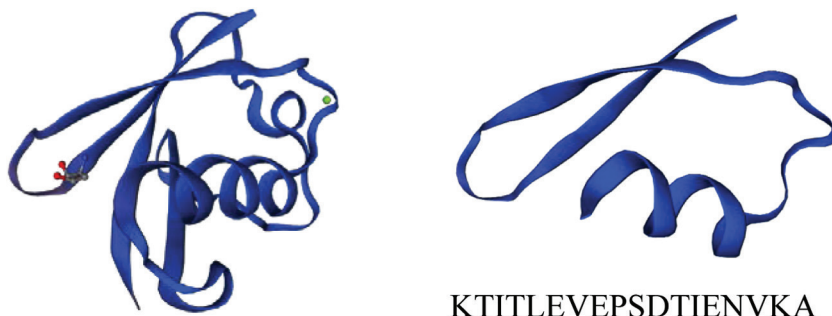


Рис.2.12. Трехмерная структура участков fructose 1,6-bisphosphate aldolase Артемии Аральского моря в сравнении с fructose 1,6-bisphosphate aldolase *Artemia franciscana*.

Fructose 1,6-bisphosphate aldolase (FBA) - консервативный гликолитический фермент артемии. Fructose 1,6-bisphosphate aldolase (FBA) - это фермент, участвующий в гликолитическом пути Эмбдена-Мейерхоф-Парнаса (ЕМР) и в глюконеогенезе.

Ubiquitin unit IV. Два участка, идентифицированные в Артемии Аральского моря, гомологичны участку белка убиквитина *Artemia franciscana* (рис.2.13).



KTITLEVEPSDTIENVKA

Рис.2.13. Трехмерная структура участка ubiquitin unit IV Артемии Аральского моря в сравнении с убиквитином *Artemia franciscana*.

Белок убиквитин является ковалентным модификатором белков, в том числе и самого себя. Система убиквитина имеет широкое применение: в качестве компонентов для усиления экспрессии генов или регулирования количества белка в присутствии стрессовых реакций. Убиквитин представляет собой белок β -хватательной складки, состоящий из 3,5 витков амфипатической α -спирали и короткой спирали 3, упакованной против пятинитового β -листа с семью обратными витками.

Ribosomal protein S6. Идентифицированный участок гомологичен участку рибосомной киназы S6 *Artemia Franciscana* (рис.2.14).

Спящие цисты *Artemia* содержат высохшие гастролы, которые метаболически и физиологически неактивны. После регидратации эмбрионы возобновляют развитие за счет изменений

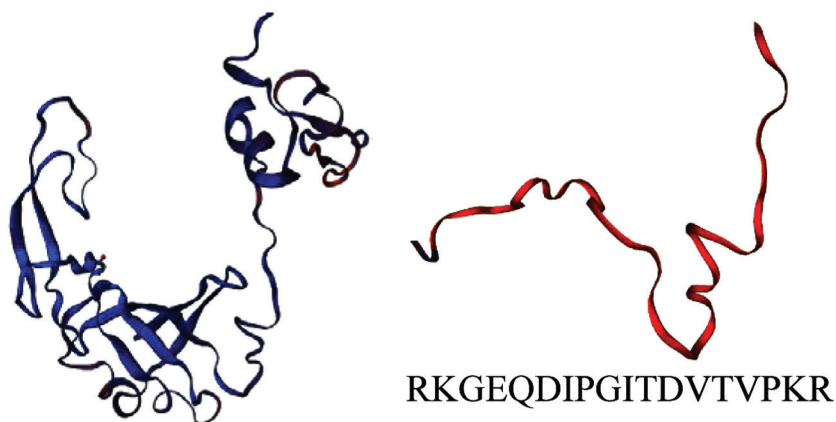


Рис.2.14. Трехмерная структура участка ribosomal protein S6 Артемии Аральского моря в сравнении с рибосомной киназой S6 *Artemia franciscana*.

в экспрессии белков при полном отсутствии деления клеток. У млекопитающих активация рибосомной киназы S6 p70 (p70S6k) участвует в контроле трансляции, в частности, в селективном повышении трансляции мРНК с полипиримидиновыми трактами в их 5'-стартовых сайтах.

Heat shock protein 70. Идентифицированный участок последовательности heat shock protein 70 гомологичен Hsp70 *Artemia urmiana* (рис.2.15).

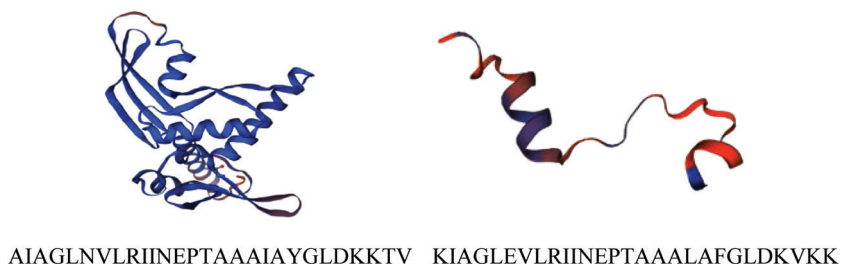


Рис.2.15. Трехмерная структура участка heat shock protein 70 Артемии Аральского моря в сравнении с heat shock protein 70 *Artemia urmiana*.

Heat shock protein 70 (Hsp70) представляет собой молекулярный шаперон, который экспрессируется в ответ на стресс. В этой роли Hsp70 связывается со своими белковыми субстратами и стабилизирует их от денатурации или агрегации, пока условия не улучшатся. Помимо своих функций во время стрессовой реакции, Hsp 70 выполняет несколько функций во время нормального роста; он способствует сворачиванию вновь синтезированных белков, субклеточному транспорту белков и везикул, образованию и диссоциации комплексов, и деградации нежелательных белков. Таким образом, этот шаперон в общих чертах формирует гомеостаз белка, контролируя контроль качества и обмен белка как в нормальных, так и в стрессовых условиях. В соответствии с этими разнообразными видами деятельности генетические и биохимические исследования выявили его причастность к ряду заболеваний, включая рак, нейродегенерацию, отторжение аллотрансплантата и инфекцию.

Помимо своей роли в бактериальной физиологии, Hsp70 также важен для иммунологических ответов хозяина и межклеточных взаимодействий. Например, в клетках млекопитающих, инфицированных вирулентной формой *S. choleraesuis*, уровни Hsp70 коррелируют с увеличением гибели клеток, индуцированной TNF- α . Hsp70 и другие белки теплового шока, также играют важную роль в передаче сигналов ИКК, эндоцитарном переносе и, возможно, в активации и регуляции иммунных клеток.

NADH dehydrogenase subunit 5. Идентифицированная субъединица гомологична дополнительной субъединице дыхательной цепи митохондриальной мембраны НАДН-дегидрогеназа (Комплекс I) *Artemia sinica*.

Комплекс I участвует в передаче электронов от НАДН в дыхательную цепь. Считается, что непосредственным акцептором электронов фермента является убихинон.

Elongation factor 1-alpha. Идентифицированная субъединица гомологична Elongation factor 1-alpha *Artemia salina* (рис.2.16).

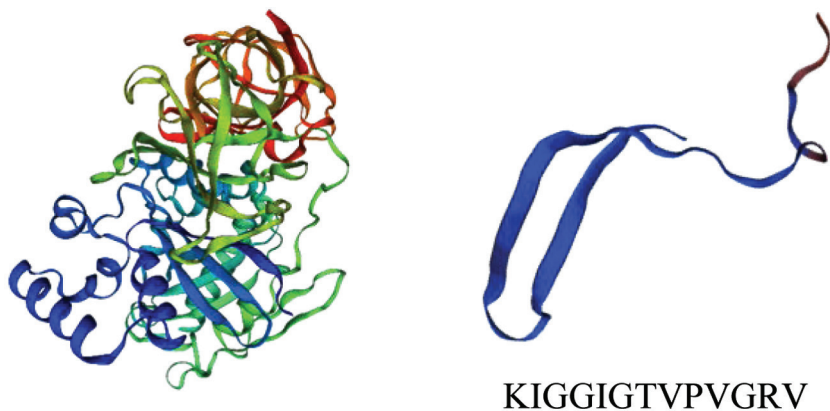


Рис.2.16. Трехмерная структура участка Elongation factor 1-alpha Артемии Аральского моря в сравнении с Elongation factor 1-alpha *Artemia salina*.0

Elongation factor 1-alpha (EF-1) регулирует специфическое взаимодействие аминоксил-тРНК с рибосомой во время фазы элонгации биосинтеза белка.

Actin-depolymerizing factor. Идентифицированный участок actin-depolymerizing factor (АДФ) гомологичен АДФ *Artemia franciscana* (рис.2.17).

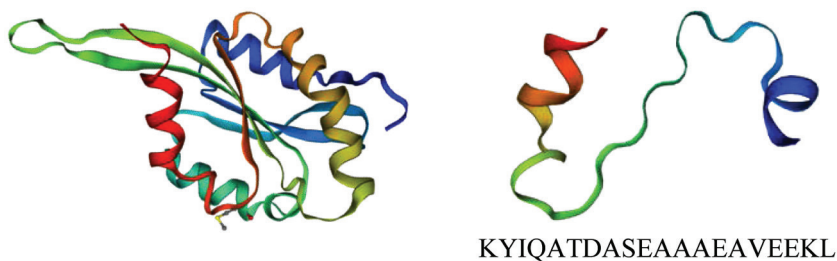


Рис.2.17. Трехмерная структура участка актин-деполимеризующего фактора Артемии Аральского моря в сравнении с актин-деполимеризующим фактором *Artemia franciscana*.

АДФ / кофилины — это небольшие актин-связывающие белки, обнаруженные у всех эукариот. In vitro АДФ / кофилины способствуют динамике актина путем деполимеризации и разрыва актиновых филаментов. АДФ и кофилин-1 млекопитающих способствуют динамике цитоскелета за счет деполимеризации актиновых филаментов.

Dicer-1. Идентифицированный фрагмент на 93% гомологичен фрагменту Дайсер-1 *Artemia franciscana*.

Dicer — рибонуклеаза из семейства РНКазы III (RNase III), которая разрезает двуцепочечные молекулы РНК и пре-микроРНК (pre-miRNA) с получением коротких двуцепочечных РНК-фрагментов, называемых малыми интерферирующими РНК (siRNA) и микроРНК (miRNA), соответственно. Данные фрагменты имеют длину приблизительно 20-25 нуклеотидов, обычно с оверхенгом в 2-3 нуклеотида на 3'-конце [121].

Dicer содержит два домена RNase III и один домен PAZ. Расстояние между этими участками в молекуле определяется длиной и углом соединяющей петли и определяет длину образующейся siRNA. *Dicer* катализирует первую стадию в процессе РНК-интерференции и инициирует образование RISC (RNA-induced silencing complex), каталитический компонент которого, белок Argonaute, является эндонуклеазой, деградирующей мРНК, комплементарные ведущей цепи siRNA [122].

Таким образом, в результате изучения состава цист Артемии Аральского моря идентифицирована последовательность белка Polyubiquitin и обнаружено 13 фрагментарных пептидов, гомологичных ранее выделенным из других видов цист Артемии:

Elongation factor-2 — содержат ингибитор синтеза белка, который важен для контроля трансляции и играет центральную роль в регуляции синтеза белка на раннем этапе развития артемии;

Actin – участвуют в различных клеточных функциях, таких как структура цитоскелета, подвижность клеток, движение хромосом и сокращение мышц;

Fructose 1,6-bisphosphate aldolase – участвуют в гликолитическом пути Эмбдена-Мейерхоф-Парнаса (ЭМП) и в глюконеогенезе;

Ubiquitin unit IV – система убиквитина имеет широкое применение: в качестве компонентов для усиления экспрессии генов или регулирования количества белка в присутствии стрессовых реакций;

Ribosomal protein S6 – активация рибосомной киназы S6 p70 (p70S6k) участвует в контроле трансляции, в частности, в селективном повышении трансляции мРНК с полипиримидиновыми трактами в их 5'-стартовых сайтах;

Heat shock protein 70 – способствует сворачиванию вновь синтезированных белков, субклеточному транспорту белков и везикул, образованию и диссоциации комплексов, и деградации нежелательных белков;

NADH dehydrogenase subunit 5 – участвует в передаче электронов от НАДН в дыхательную цепь;

Elongation factor 1-alpha – регулирует специфическое взаимодействие аминоацил-тРНК с рибосомой во время фазы элонгации биосинтеза белка;

Actin-depolymerizing factor – способствуют динамике цитоскелета за счет деполимеризации актиновых филаментов;

Dicer-1 – катализирует первую стадию в процессе РНК-интерференции и инициирует образование RISC (RNA-induced silencing complex).

Полученный белковый состав изучаемых цист показал перспективность изучения биологической активности для возможности применения соединений белковой природы в качестве БАД-иммуномодулятора и продуктов функционального питания.

ГЛАВА 3. БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ СОЕДИНЕНИЙ БЕЛКОВОЙ ПРИРОДЫ ЦИСТ АРТЕМИИ АРАЛЬСКОГО МОРЯ

Острая необходимость создания эффективных лекарственных средств из природного сырья для профилактики и лечения разнообразных заболеваний вызвана, прежде всего, отрицательным влиянием неблагоприятных экологических и стрессорных факторов на состояние здоровья и трудоспособность человека.

§ 3.1. Доклиническое исследование общей токсикологии соединений белковой природы цист *Artemia* Аральского моря

§ 3.1.1. Изучение острой токсичности

Общее действие и «острую» токсичность суммы белковой природы цист *Artemia* определяли на мышах и крысах при однократном пероральном введении. Каждая доза вещества исследовалась на 10 животных. Наблюдение вели в течение 14 дней.

Для определения параметров «острой» токсичности был использован метод Литчфилда и Уилкоксона [123]. Препарат вводили перорально в дозах 1000, 2000, 3000, 4000 и 5000 мг/кг.

Таблица 3.1.

Результаты показателей «острой» токсичности соединений белковой природы цист *Artemia*

Дозы, мг/кг	Путь введения	Сумма белковой природы цист <i>Artemia</i>		ЛД50 -m+m мг/кг
		Кол-во крыс погибшие/ всего	Кол-во мышей погибшие/ всего	

1000	пероральный	0/10	0/10	≥ 5000
2000		0/10	0/10	
3000		0/10	0/10	
4000		0/10	0/10	
5000		0/10	0/10	

В изученных дозах исследуемое вещество не вызывало токсических эффектов в поведении животных. У животных наблюдалась отдышка, вялость. Эти явления исчезали через 15 минут.

Гибели животных на протяжении всего эксперимента не отмечено. Средняя летальная доза (LD50) при однократном пероральном введении суммы белковой природы цист *Artemia* у мышей и крыс составляет более 5000мг/кг (таблица 3.1).

Изучение острой токсичности суммы белковой природы показало, что этот препарат относится к IV классу малотоксичных соединений. LD50 - более 5000 мг/кг при пероральном введении на мышах и крысах.

§ 3.1.2. Исследование кумулятивного свойства соединений белковой природы цист *Artemia*

При выборе доз для исследования хронической токсичности фармакологических веществ, следует учитывать его кумулятивное действие. Поэтому до проведения хронических токсикологических экспериментов мы изучали кумуляцию методом субхронической токсичности по методу Lim и соавт, который позволяет оценить не только кумулятивные свойства, но и привыкание, и определяли индекс кумуляции, отношение LD50 при однократном введении к LD50 при кратном введении [124].

Опыты были поставлены на 10 мышах обоего пола массой 20 ± 2 г. Животным ежедневно перорально вводили сумму белковой природы из цист *Artemia* по следующей схеме (таблица 3.2).

Таблица 3.2

Изучение кумулятивного действия

Дни введения	Число животных (n=10)	Доля от LD50	LD50 $\geq$ 5000 мг/ кг
1-4	0/10	0,1	500
5-8	0/10	0,15	750
9-12	0/10	0,22	1540
13-16	0/10	0,34	1700
17-20	0/10	0,50	2500
21-24	0/10	0,75	3750
25-28	0/10	1,12	5750

Суммарная доза за 28 дней 57LD50, максимальная продолжительность эксперимента 24 ± 4 дня. $K_k = LD50_n / LD50_1$, где K_k = коэф. кумуляции, LD50_n – средняя смертельная доза при n-кратном введении, LD50₁ – средняя смертельная доза при однократном введении.

$K_k \geq 1$ привыкание;

$K_k \leq 1$ кумуляция.

Установлено, что сумма белковой природы из цист *Artemia* не обладает кумулятивным действием.

§ 3.1.3. Изучение хронической токсичности соединений белковой природы цист *Artemia*

Общетоксическое действие суммы белковой природы из цист *Artemia* при пероральном многократном введении было изучено на 40 нелинейных белых крысах (самцах и самках) с начальной массой 140 ± 10 г и 12 кроликах серой масти обоего пола с начальной массой $2,0 \pm 0,2$ кг. Животные находились в условиях вивария на обычном рационе питания. Препарат вводили перорально ежедневно (7 дней в неделю) в течение 1 месяца.

Подопытные животные были поделены на 3 группы, крысы по 10 шт. (5 самцов и 5 самок).

1 группа крыс - контрольная, получала дистиллированную воду в объеме 2 мл.

2 группа крыс - опытная, получала сумму белковой природы из цист *Artemia* в дозе 15 мг/кг

3 группа крыс - опытная, получала сумму белковой природы из цист *Artemia* в дозе 30 мг/кг.

Состояние животных при пероральном хроническом введении оценивали по следующим параметрам периферической крови: содержанию гемоглобина, числу эритроцитов, ретикулоцитов, тромбоцитов, лейкоцитов и лейкограмме; оценку функции печени - по содержанию глюкозы, общего белка, аланин - и аспартат - аминотрансфераз (АлАТ, АсАТ).

Биохимические тесты определяли с помощью тест наборов, выпускаемых фирмой ООО «Фармбiodиагностика», Ташкент. О функции почек судили по диурезу с водной нагрузкой (5% от массы тела) за 4 часа, кислотности мочи (рН), мочеvine крови, наличию сахара и белка в моче (качественные реакции) и мочевым осадкам. [125].

Гематологические и биохимические исследования проводили через 10 дней и 1 месяц с начала эксперимента. В эти же самые сроки животных взвешивали. В конце эксперимента часть животных забивали декапитацией и забирали материал для патоморфологических исследований, согласно перечню, утверждённому Фармакологическим Комитетом РУз □126□. Часть животных оставляли для изучения процесса восстановления.

§ 3.1.3.1. Результаты исследования состава периферической крови крыс под влиянием соединений белковой природы цист *Artemia*

Расчет дозы: Терапевтическая доза препарата на мышах составляет 30 мг/кг

Для крыс: $30 \times 3 (\text{коэф. мыш}) / 6 (\text{коэф. крыс.}) = 15 \text{ мг/кг}$

Полученные результаты от перорального ежедневного введения суммы белковой природы из цист *Artemia* крысам, представлены в таблице 3.3.

Таблица 3.3

Состав периферической крови крыс при ежедневном пероральном введении суммы белковой природы из цист *Artemia* в течение 10 дней (M□m; n=10)

Показатели	Контрольная	Доля от LD50	LD50 ≥ 5000 мг/кг
Группа	Субстанция	0,1	500
15мг/кг	Субстанция	0,15	750
30мг/кг	0/10	0,22	1540
Гемоглобин, г/дл	12,88□0,2	11,8□0,7	14,0□0,1
Эритроциты, 10 ¹² /л	4,5□0,5	4,8□0,5	5,0□0,6
Ретикулоциты, %	4,0□0,4	2,5□0,6	2,0□0,5
Тромбоциты, 10 ⁹ /л	625,0□11,5	450,0□12,5*	775,0□13,0*
Нейтрофилы:			
палочкоядерные, %	1,8□0,2	2,0□0,2	2,0□0,2
сегментоядерные, %	25,0□1,0	27,4□0,2	27,2□0,8
эозинофилы, %	2,0□0,2	2,0□0,2	2,0□0,2
моноциты, %	3,0□0,3	2,6□0,2	2,9□0,3
лимфоциты, %	64,2□1,8	66,0□3,4	66,8□3,2
Цветной показатель	0,9	0,64	0,72

*P<0,05 по отношению к контролю

В составе периферической крови крыс под влиянием исследуемых доз суммы не выявлено достоверных отклонений в содержании гемоглобина в эритроцитах, в количестве самих кровяных телец, его предшественников (ретикулоцитов), а также лейкоцитов. Показатели лейкоцитарной формулы у крыс находятся в пределах физиологической нормы и не отличаются от таковых в контроле.

На основании чего можно заключить, что сумма белковой природы из цист *Artemia* в дозах 15 и 30 мг/кг при пероральном многократном введении не оказывает токсического действия на количественный состав и морфологию периферической крови.

§ 3.1.3.2. Функциональное состояние почек крыс под воздействием соединений белковой природы цист *Artemia*

При исследовании диуретического состояния почек через 10 дней эксперимента в условиях водной нагрузки показатели не отличались значимо у подопытных и контрольных крыс. Функциональное состояние азотистого обмена, критерием которого служит содержание мочевины в крови, не имело отклонений от контроля через 10 дней экспериментального исследования.

Сахар и белок в моче в течение всего эксперимента, как в опытных группах, так и контрольной группе отсутствовали. Кислотность мочи во всех изученных группах не изменялась в течение всего опыта и её рН составляла 7,0 (таблица 3.4).

Таблица 3.4

Некоторые показатели функции почек крыс, получавших сумму белковой природы из цист *Artemia* в течение 10 дней ($M \pm m$; $n=10$)

Сроки исследования	Сроки исследования	Доза препарата, мг/кг	Диурез за 4 часа, %	Мочевина крови, ммоль/л
10 дней введения	1	Контроль	$98 \pm 5,4$	$4,4 \pm 0,42$
	2	15	$88 \pm 5,6$	$4,6 \pm 0,4$
	3	30	$89 \pm 5,4$	$4,2 \pm 0,4$

* $P > 0,05$ по отношению к контролю

Патологических изменений в содержании осадков мочи не обнаружено. Полученные результаты позволили сделать вывод о том, что сумма не оказывает токсического действия на функцию почек.

§ 3.1.3.3. Функциональное состояние печени крыс при хроническом введении соединений белковой природы цист *Artemia* в течение 10 дней

Функция печени крыс в эксперименте исследована по чувствительным тестам через 10 дней. Уровень общего белка, глюкозы, активность ферментов (АсАТ, АлАТ) в сыворотке у всех подопытных крыс через 10 дней незначительно отличались от контроля (таблица 3.5).

Таблица 3.5

Некоторые показатели функции печени крыс, получавших сумму белковой природы из цист *Artemia* в течение 10 дней ($M \pm m$; $n=10$)

Сроки	Доза мг/кг	Общий белок, г/дл	АлАТ, ммоль/л	АлАТ, ммоль/л	Глюкоза, ммоль/л	Мочевина ммоль/л
исследования	контроль	$7,9 \pm 0,6$	$0,06 \pm 0,003$	$0,05 \pm 0,004$	$3,37 \pm 0,3$	$2,2 \pm 0,16$
	10 дней	$8,3 \pm 5,4^*$	$0,1 \pm 0,01$	$0,07 \pm 0,003$	$3,8 \pm 0,2$	$2, \pm 0,15$
	30	$7,1 \pm 5,6$	$0,07 \pm 0,005$	$0,05 \pm 0,002$	$4,2 \pm 0,3$	$2,4 \pm 0,16$

* $P \leq 0,05$ по отношению к контролю.

При пероральном ежедневном введении в дозах 15 мг/кг суммы из цист *Artemia* показатель АлАТ увеличился с $0,06 \pm 0,003$ до $0,1 \pm 0,01$, тем самым оказывая токсическое действие на функцию печени.

§ 3.1.3.4. Изучение интегральных показателей у подопытных животных

Динамика массы тела подопытных животных через 10 дней и 1 месяц эксперимента не отличалась от контроля. Животные на протяжении всего эксперимента были активны, опрятны, корм поедали нормально, пили воду, шерсть у них была гладкая, блестящая. Поведение подопытных крыс и кроликов не отличалось от поведения контрольных групп животных.

При макроскопическом исследовании забитых животных выявлено правильное расположение внутренних органов. Свободной жидкости в плевральной и брюшной полостях нет. Слизистая оболочка полости рта чистая, влажная, характерного цвета, отёков, кровоизлияний не обнаружено. Ткани легких, желудка и кишечника также характерного цвета, без признаков отека, кровоизлияний и изъязвлений. Поджелудочная железа, почки и надпочечники без изменений.

При пероральном ежедневном введении в дозах 15 и 30 мг/кг суммы белковой природы из цист *Artemia* в течении 10 дней не выявило патологических отклонений в интегральных показателях внутренних органов животных.

§ 3.2. Доклиническое изучение специфической фармакологии соединений белковой природы цист *Artemia*

§ 3.2.1. Изучение влияния соединений белковой природы цист *Artemia* на количество клеток паренхиматозных органов и макрофагов в перитониальной жидкости

Цель данного исследования — изучение иммуностимулирующего действия образцов соединений белковой природы цист Артемии.

Определение активности препаратов проводили биологическим методом по их способности *in vivo* увеличивать количество ядродержащих клеток (ЯСК) тимуса, селезенки и лимфоузлов, а также макрофагов в перитониальной жидкости у интактных мышей.

Активность образцов определяли на мышах обоего пола при массе тела 26-30 г (1-я серия) и $18 \pm 1,5$ г (2-я серия). Препараты вводили однократно перорально в дозе 100 мг/кг. На каждую точку брали 5 мышей.

Через 24 часа животных забивали декапитацией. У мышей извлекали тимус, селезенку и лимфоузел взвешивали и готовили клеточную взвесь в изотоническом растворе натрия хлорида (из расчета 100мг массы органа в 20 мл). Подсчет ядродержащих клеток производили в камере Горяева под микроскопом, при 20 кратном разведении взвеси клеток в 3% растворе уксусной кислоты. Мышам за 10 минут до забоя вводили внутривентрально по 1 мл физиологического раствора натрия хлорида 0,9 %. После декапитации вскрывали брюшную полость и забирали пипеткой Сали 0,02 мл экссудата и добавляли в пробирку с 3% раствором уксусной кислоты 0,4 мл. Подсчет производили во всех больших квадратах. Полученные данные обрабатывали статистически.

Результаты исследования приведены в таблице 3.6.

Предварительные исследования влияния образцов на самую древнюю клетку – макрофаг, отвечающую за неспецифическую резистентность организма, выявили достоверные различия.

В первой серии количество макрофагов в перитонеальной жидкости у интактных мышей составило $155 \pm 12 \cdot 10^6$ /мл. Через 24 часа после введения образца в дозе 100 мг/кг у мышей количество макрофагов в перитонеальной жидкости составило $266 \pm 14,0 \cdot 10^6$ /мл. Индекс стимуляции соответственно равен 1,7.

Таблица 3.6

Влияние соединений белковой природы на вес и количество ядросодержащих клеток паренхиматозных органов и макрофагов в перитонеальной жидкости через 24 часа после однократного введения ($M \pm m$; $n=10$)

Препараты	макрофаги										
			тимус			Селезенка			Лимфоузел		
	10 ⁹ /мл	ИС	Мг	10 ⁹ /мл	ИС	мг	10 ⁹ /мл	ИС	мг	10 ⁹ /мл	ИС
контроль	155 ± 12		$38 \pm 2,8$	$32 \pm 2,1$		$80 \pm 6,3$	100 ± 10		$7,5 \pm 0,6$	$30 \pm 2,6$	
1 серия	266 ± 16	1,7	$46 \pm 2,8^*$	$57 \pm 4,1^*$	1,8	$155 \pm 12^*$	$155 \pm 12^*$	1,5	$10,5 \pm 6^*$	$53 \pm 3,6^*$	1,8
контроль	116 ± 11		$36,5 \pm 2,8$	$100 \pm 8,4$		$47 \pm 3,4$	115 ± 10		$5,5 \pm 0,4$	$25 \pm 2,4$	
2 серия	$160 \pm 14^*$	1,4	$47,3 \pm 2,8^*$	$163 \pm 12,1^*$	1,6	$69 \pm 5,2^*$	$130 \pm 12^*$	1,2	$7,0 \pm 0,5^*$	$70 \pm 5,2^*$	2,8

* $P \leq 0,05$ по отношению к контрольной группе

Из приведенных данных в таблице 3.6 видно, что количество макрофагов в перитонеальной жидкости у интактных мышей во второй серии составило $116 \pm 11 \cdot 10^6$ /мл. Через 24 часа

после введения образца в дозе 100 мг/кг у мышей количество макрофагов в перитонеальной жидкости составило $160 \pm 14,0 \cdot 10^6$ /мл. Индекс стимуляции соответственно равен 1,4.

Анализ влияния образца на вес и количество ядродержащих клеток тимуса, это в основном Т клетки - клеточный иммунитет организма, показал, что количество ЯСК тимуса у контрольных животных составило $32 \pm 2,4 \cdot 10^9$ /тимус, а вес тимуса $38 \pm 2,8$ мг. После введения изучаемых соединений в первой серии количество ЯСК тимуса в дозе 100 мг/кг через 24 часа увеличилось до $57 \pm 4,1 \cdot 10^9$ /тимус, ИС равен 1,8. Вес тимуса опытных мышей был увеличен на 18% до $46 \pm 2,8$ мг.

Во второй серии опытов количество ЯСК тимуса у контрольных животных составило $100 \pm 8,4 \cdot 10^9$ /тимус, а вес тимуса $36,5 \pm 2,8$ мг. После введения изучаемых соединений количество ЯСК тимуса в дозе 100 мг/кг через 24 часа увеличилось до $163 \pm 12,1 \cdot 10^9$ /мл, ИС равен 1,63. Вес тимуса опытных мышей был увеличен на 30% до $47,3 \pm 2,8$ мг.

Анализ влияния на вес и количество ядродержащих клеток селезенки – это, в основном, В клетки – гуморальный иммунитет организма, показал, что количество ЯСК селезенки у контрольных животных составило $100 \pm 2,0 \cdot 10^9$ /мл, а вес селезенки $80 \pm 6,8$ мг. После введения образца во второй серии количество ЯСК селезенки в дозе 100 мг/кг через 24 часа увеличилось до $155 \pm 12 \cdot 10^9$ /мл, ИС равен 1,5. Вес селезенки опытных мышей увеличился на 89% и составил 125 ± 12 мг.

Анализ влияния на вес и количество ядродержащих клеток селезенки, показал, что количество ЯСК селезенки у контрольных животных составило $115 \pm 10,0 \cdot 10^9$ /мл, а вес селезенки $47 \pm 3,4$ мг. После введения изучаемых соединений количество ЯСК селезенки в дозе 100 мг/кг через 24 часа увеличилось до $130 \pm 12 \cdot 10^9$ /мл, ИС равен 1,13. Вес селезенки опытных мышей увеличился на 47% и составил $69 \pm 5,2$ мг.

Анализ влияния соединений в серии 2 на вес и количество ядросодержащих клеток лимфоузлов, показал, что количество ЯСК селезенки у контрольных животных составило $25,0 \pm 2,4 \cdot 10^9$ /мл, а вес лимфоузла $5,5 \pm 0,4$ мг. После введения образца во второй серии количество ЯСК лимфоузлов в дозе 100 мг/кг через 24 часа увеличилось до $70 \pm 5,2 \cdot 10^9$ /мл, ИС равен 2,8. Вес лимфоузлов опытных мышей увеличился на 30% и составил $7,0 \pm 0,5$ мг.

Как видно из данных, приведенных в таблице 3.6, количество ЯСК лимфоузлов у контрольных животных составило $30 \pm 2,0 \cdot 10^9$ /мл, а вес лимфоузла $7,5 \pm 0,4$ мг. После введения изучаемых соединений количество ЯСК лимфоузла в дозе 100 мг/кг через 24 часа увеличилось до $53 \pm 3,6 \cdot 10^9$ /мл, ИС равен 1,8. Вес лимфоузлов опытных мышей увеличился на 33% и составил $10,5 \pm 6$ мг.

Установлено, что соединения белковой природы цист Артемии оказывают стимулирующее действие на иммунную систему у старых мышей (результаты во второй серии экспериментов). При этом повышается как не специфическая резистентность организма, так и клеточный и гуморальный иммунитет.

§ 3.2.2. Исследование антигипоксической активности соединений белковой природы цист *Artemia*

Гипоксии принадлежит решающая роль как в возникновении, так и в течении многих заболеваний, так как «любое патологическое состояние прямо или косвенно связано с нарушением кислородного бюджета организма» [127, 128, 129]. Гипоксия — патологический процесс, возникающий в результате недостаточного снабжения тканей кислородом или нарушения использования его тканями.

Гемическая гипоксия возникает в связи с уменьшением кислородной емкости крови. В патологических условиях возможно образование таких соединений гемоглобина, которые не могут выполнять дыхательную функцию. Таким является

карбоксигемоглобин — соединение гемоглобина с окисью углерода. Сродство гемоглобина к окиси углерода в 300 раз выше, чем к кислороду, что обуславливает высокую ядовитость угарного газа: отравление наступает при ничтожных концентрациях окиси углерода в воздухе. При этом инактивируется не только гемоглобин, но и железосодержащие дыхательные ферменты. Такое случается при заболеваниях крови, влияющих на активность гемоглобина, а также после значительной потери крови при ранениях и повреждениях кровеносной системы.

Воздействие гипоксии/ишемии мозга способствует нарушению нейромедиаторного баланса, обмена медиаторов в мозге [130], а также развитию гибели клеток [131]: гипоксия изменяет работу генетического аппарата клетки и может инициировать транскрипцию специфических генов, ответственных за программируемую гибель клетки [132].

Антигипоксическое действие компонентов белковой природы цист *Artemia* исследовали на двух моделях: цитотоксическая гемическая и нормобарическая гипоксия.

Цитотоксическую гемическую гипоксию вызывали подкожным введением нитритом натрия NaNO_2 в дозе 400 мг/кг массы тела, от которой погибали 100% животных. Гемическая гипоксия возникает вследствие нарушений в системе крови, а именно — уменьшения её кислородной емкости. В организме образуется патологическая форма гемоглобина, называемая карбоксигемоглобином — соединения гемоглобина с окисью углерода. Нитрит натрия, являясь производным азотной кислоты, в организме превращается в нитрат натрия, который окисляет двухвалентное железо гемоглобина до трехвалентного железа. Это приводит к образованию метгемоглобина, не способного обратимо связывать кислород. В результате этих процессов нарушается транспорт кислорода кровью и возникает гемическая гипоксия. Критерием оценки антигипоксического действия исследуемых веществ по данной методике, является увеличение

времени наступления первых судорог, увеличение время жизни животного по сравнению с контролем [133].

Экспериментальные исследования были проведены на 60 белых лабораторных мышах обоего пола массой тела $30 \pm 2,0$ г. по 10 животных в группе. Белковую сумму экспериментальным мышам вводили перорально в дозах 20, 30, 40, 50 мг/кг за 1 час до начала моделирования гипоксии. Интактной группе животных вводили дистиллированную воду перорально в биоэквивалентном объеме. Полученные результаты обрабатывали методом вариационной статистики [134]. Результаты экспериментов приведены в таблице 3.7.

Как видно из данных, приведенных в таблице 3.7, продолжительность жизни в интактной группе животных составила $11,6 \pm 1,0$ минут. При введении дистиллированной воды (контроль) мышам продолжительность жизни увеличилась до $12,0 \pm 1,1$ мин., а антигипоксический эффект соответственно составил 13,5%.

При введении белковой суммы из цист *Artemia* в дозе 20 мг/кг продолжительность жизни увеличилась до $17,5 \pm 1,2$ мин., антигипоксический эффект соответственно составил 45,8%. Наилучший показатель по антигипоксической активности был выявлен при введении белковой суммы в дозе 30 мг/кг, которая составила $19,5 \pm 1,2$ или 62,5%.

Таблица 3.7

Влияние белковой суммы из цист *Artemia* на цитотоксическую гемическую гипоксию ($M \pm m$; $n=10$)

Препарат	Доза, мг/кг	Время исследования, часы	Кол-во животных	Продолжительность жизни, мин	Антигипоксич. эффект, %
Интакт	-	1	10	$11,6 \pm 1,0$	-
Контроль					
Дист.вода	-	1	10	$12,0 \pm 1,1$	13,5

Белковая сумма	20	1	10	17,5±1,2	45,8
Белковая сумма	30	1	10	19,5±1,2	62,5
Белковая сумма	40	1	10	16±1,2	33
Белковая сумма	50	1	10	13,5±1,2	16

* $P < 0,05$ по отношению к контролю

Исследование белковой суммы в дозе 40 и 50 мг/кг показало уменьшение антигипоксического эффекта по отношению к дозе 30 мг/кг. В экспериментальной группе животных, применявших дозу 40 мг/кг продолжительность жизни, составила $16 \pm 1,2$, или 33%, а в дозе 50 мг/кг - $13,5 \pm 1,2$ или 16%.

Нормобарическая гипоксия развивается при нормальном общем барометрическом давлении. В организме животного помещенного в банку с плотно закрытой крышкой объемом 250мм³ возникает артериальная гипоксемия – уменьшение напряжения кислорода в плазме артериальной крови, приводящей к недостаточному насыщению гемоглобина кислородом и снижению его содержания в крови. На фоне острой недостаточности кислорода животное в опыте гибнет. Увеличение длительности жизни животного по сравнению с контролем, будет считаться положительной оценкой антигипоксического действия изучаемой субстанции [133].

Экспериментальные исследования были проведены на 60 белых лабораторных мышах обоего пола массой тела $30 \pm 2,0$ г. по 10 животных в группе. Белковую сумму экспериментальным мышам вводили перорально в дозах 20, 30, 40, 50мг/кг за 1 час до начала моделирования гипоксии. Интактной группе животных вводили дистиллированную воду перорально в биоэквивалентном объеме. Полученные результаты обрабатывали методом вариационной статистики [134]. Результаты экспериментов приведены в таблице 3.8.

Таблица 3.8

Влияние белковой суммы из цист *Artemia* на нормобарическую гипоксию ($M \pm m$; $n=10$)

Препарат	Доза, мг/кг	Время исследования, часы	Кол-во животных	Продолжительность жизни, мин	Антигипоксич. эффект, %
Интакт	-	1	10	13,4 $\pm$ 1,0	-
Контроль	-	1	10	15,0 $\pm$ 1,2	12
Дист.вода	20	1	10	18,3 $\pm$ 1,7	36,6
Белковая сумма	30	1	10	21,3 $\pm$ 2,1	59
Белковая сумма	40	1	10	17,1 $\pm$ 1,4	28
Белковая сумма	50	1	10	15,5 $\pm$ 1,3	15,7
Белковая сумма	50	1	10	13,5 $\pm$ 1,2	16

* $P < 0,05$ по отношению к контролю

Приведенные данные в таблице 3.8 показывают, что проведенные исследования дополняют предыдущие и также подтверждают влияние белковой суммы на метаболизм кислорода. Продолжительность жизни в интактной группе животных составило 13,4 $\pm$ 1,0 минут. При введении дистиллированной воды (контроль) мышам продолжительность жизни незначительно увеличилась до 15,0 $\pm$ 1,2 мин., а антигипоксический эффект соответственно составил 12%.

При введении белковой суммы из цист *Artemia* в дозе 20 мг/кг продолжительность жизни увеличилась до 18,3 $\pm$ 1,7 мин., а антигипоксический эффект соответственно составил 36,6%.

Наилучший показатель по антигипоксической активности, аналогично с предыдущей моделью гипоксии, также выявлен при введении белковой субстанции в дозе 30 мг/кг, которая составила

21,3±2,1 или 59%. В экспериментальной группе животных, применявших дозу 40 мг/кг, продолжительность жизни составила 17,1±1,4 или 28%, а в дозе 50 мг/кг - 15,5±1,3 или 15,7%.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что сумма белковых компонентов цист *Artemia* обладает выраженными антигипоксическими свойствами, повышая устойчивость мышей к гипоксии разного генеза. Наиболее выраженные антигипоксические свойства испытуемое средство проявляет в дозе 30 мг/кг.

§ 3.2.3. Влияние соединений белковой природы цист *Artemia* на судорожное действие коразола

Тест антагонизма с пентилентетразолом (коразолом) является одной из основных методик в первичном исследовании противосудорожных препаратов [131]. Судорожный медиатор – коразол стимулирует центральную нервную систему, в частности повышает возбудимость дыхательного и сосудодвигательного центров. В результате повышается артериальное давление, улучшается и восстанавливается кровообращение, увеличивается объем легочной вентиляции и учащается ритм дыхания. Эти эффекты наиболее выражены при падении кровяного давления и угнетении дыхания. Замедление сердечного ритма обусловлено возбуждающим действием препарата на центры блуждающих нервов.

Исследование влияния суммы белковых компонентов на судорожное действие коразола было проведено на белых беспородных мышах массой 20±2г по 5 в каждой группе.

Коразол вводили подкожно в область затылка в дозе 75 мг/кг, который вызывал судороги у 60% мышей со средним латентным периодом 10,7 мин. Смертности не наблюдалось (таблица 3.9).

У экспериментальных мышей в дозе 15 мг/кг при предварительном введении субстанции за 1 час до судорожного

медиатора, судороги наблюдались у 2 мышей из 5 (40%). Гибели животных не наблюдалось, и средний латентный период увеличился до $15,0 \pm 1,2$ мин или на 40%. В дозе 30 мг/кг число судорожных приступов составило 2 из 5, также 40%. Гибель животных отсутствовала, наблюдалось удлинение латентного периода с $10,7 \pm 0,7$ в контрольной группе животных до $18,0 \pm 1,8$ минут или на 68%.

При исследованиях компонентов в дозе 60 мг/кг при предварительном введении субстанции за 1 час до судорожного средства, судороги наблюдались у 2 мышей из 5 (40%). Гибели животных не наблюдалось, и средний латентный период увеличился до $11,0 \pm 1,0$ мин (13%).

Таблица 3.9.

Влияние белковой суммы из цист *Artemia* на судорожное действие коразола ($M \pm m$; $n=5$)

Препарат доза, мг/кг	Латентный период		Судороги		Гибель	
	Время, сек	%	Количество	%	Количество	%
Контроль	$10,7 \pm 0,7$	100	3	60	0	0
Сумма 15	$15,0 \pm 1,2$	140	2	40	0	0
30	$18,0 \pm 1,8^*$	168	2	40	0	0
60	$11,0 \pm 1,0$	113	2	40	0	0

* $P \leq 0,1$ по отношению к контрольной группе

Определено, что сумма белковой природы из цист *Artemia* не влияет на судорожное действие коразола во всех исследуемых дозах. При использовании дозы в концентрации 30 мг/кг, токсическое действие судорожного медиатора достигает наибольшего эффекта, увеличивая латентный период, т.е. удлиняя токсический эффект коразола на 68 %.

§ 3.2.4. Влияние соединений белковой природы цист *Artemia* на судорожное действие стрихнина

Для оценки влияния исследуемых соединений на глицинергические механизмы патогенеза судорожного синдрома у мышей использовали модель судорог, вызванных стрихнином.

Влияние препарата на судорожное действие стрихнина, было проведено на белых беспородных мышах массой 20 ± 2 г по 5 в каждой группе (таб. 3.10).

Стрихнин вводили в дозе 1,2 мг/кг подкожно (контрольная группа). В экспериментальных группах мышам за 1 час до судорожного медиатора вводили сумму из цист *Artemia* в дозах 15, 30 и 60 мг/кг перорально, а контрольным дистиллированную воду в соответствующем объеме.

Установлено, что в контрольной группе животных судорожные приступы наблюдались у 1 мыши из 5 (20%), латентный период в среднем наступал через 10,0 мин. У контрольных мышей отмечалось повышение рефлекторной возбудимости на болевое раздражение, на резкие звуки и стук по поверхности стола, иногда провоцирующие начало судорог.

В экспериментальной группе при исследовании дозы 15 мг/кг судороги проявились лишь у 1 мыши из 5, латентный период составил 5 мин и пала 1 мышь из 5, что составило 20% по отношению к контрольной группе. Повышенная рефлекторная возбудимость на вышеуказанный стимулятор отсутствовала.

Изучаемая сумма в дозе 30 мг/кг увеличила латентный период на 20% и составил 12 мин, а количество судорог было у 1 мышей из 5 (20%). Гибель наблюдалась у 1 мыши (20%).

В экспериментальной группе при дозе 60 мг/кг судороги проявились лишь у 1 мыши из 5, латентный период составил 3,9 мин и пала 1 мышь из 5, что составило 20%, по отношению к контрольной группе.

Таблица 3.10

Влияние белковой суммы из цист *Artemia* на судорожное действие стрихнина ($M \pm m$; $n=5$)

Препарат доза, мг/кг	Латентный период		Судороги		Гибель	
	Время, сек	%	Количество	%	Количество	%
Контроль	10,0 $\pm$ 1,0	100	1	20	0	0
Сумма 15	5,0 $\pm$ 0,4*	50	1	20	1	20
30	12,0 $\pm$ 1,1	120	1	20	1	20
60	3,9 $\pm$ 0,35	39	2	40	1	20

* $P \leq 0,1$ по отношению к контрольной группе

Сумма из цист *Artemia salina* в дозе 30 мг/кг не влияла на количество судорог, но увеличивала латентный период в 20 %, т.е. препарат смягчал судорожную активность на фоне стрихнина. В дозах 15 и 60 мг/кг значительно провоцировал судорожную активность стрихнина на 50% и 61%.

§ 3.2.5. Влияние соединений белковой природы цист *Artemia* на стресс-протекторное действие

Стресс-протекторное влияние суммы белковой природы изучено на моделях плавания с грузом до отказа. Для животных длительное плавание, приводящее к утомлению, является стрессом. Данная модель предназначена для определения характеристик активности препарата при нагрузке смешанной мощности (анаэробно-аэробной).

Для оценки времени плавания используют емкость из органического стекла размером 20*20*80 см наполненную водой. Расстояние от воды до емкости не менее 10 см.

Исходными показателями работоспособности животных является максимальное время плавания с грузом, масса которого

5% от массы тела при температуре воды в емкости от 29 до 300С. Оцениваемым показателем является время плавания до отказа.

Исследование влияния суммы на стресс-протекторное действие было проведено на 40 белых беспородных мышах массой 20 ± 2 г по 10 в каждой группе. Экспериментальным мышам за 1 час до начала эксперимента вводили сумму белковой природы в дозе 15, 30 и 45 мг/кг. Контрольной группе животных вводили дистиллированную воду в эквивалентном соотношении (таблица 3.11).

В контрольной группе животных продолжительность плавания составила 312 секунд – 100%. В дозе 30 и 60 мг/кг продолжительность плавания сократилась до 261 и 241 сек, соответственно. Это в пересчете на процент составило 84 % и 77 %, что на 16% и 23% ниже, чем в контрольной группе.

Таблица 3.11

Влияние белковой суммы из цист *Artemia* на стресс-протекторное действие ($M \pm m$; $n=10$)

Препарат доза, мг/кг	Латентный период, сек	Продолжительность плавания	
		сек	%
Контроль	2	312	100
Сумма 15	3	479	153
30	1	261	84
60	2	241	77

При исследовании дозы 15 мг/кг продолжительность была 479 сек – 153 %, что на 53% выше, чем в контрольной группе.

Таким образом, исследование стресс-протекторного действия показало, что наилучший стресс-протекторный эффект наблюдался при введении дозы 15 мг/кг.

§ 3.3. Доклиническое изучение специфической токсикологии соединений белковой природы цист *Artemia*

§ 3.3.1. Местно-раздражающее действие соединений белковой природы цист *Artemia*

§ 3.3.1.1. Конъюнктивальная проба

Конъюнктивальная проба является очень чувствительным тестом. В ряде случаев позволяет выявить реакцию животных на аллерген при слабой аллергизации и отрицательных кожных тестах [135].

Опыты были поставлены на 10 кроликах, массой 2,5-3,0 кг, которым в левый глаз закапывали по 0,1мл 0,5 и 5 % раствора субстанции, во второй глаз (контрольный) вводили 0,1мл дистиллированной воды. На каждую концентрацию брали по 3 кролика.

Реакцию учитывали через 15 минут (быстрая реакция) и через 24-48 часов (гиперчувствительность замедленного типа) и оценивали по следующей шкале (в баллах):

- 1 – реакции нет (0 баллов);
- 2 - легкое покраснение конъюнктивы (1 б.);
- 3 – покраснение всей конъюнктивы и частично склеры (2 б.)
- 4 - резкое покраснение конъюнктивы и всей склеры, гнойный офтальмит (3 б.).

Кроме того, учитывали степень гиперемии, отечность, лакримацию.

Результаты наблюдений показали, что сумма из цист *Artemia* ни через 15 минут, ни через 24 и 48 часов не вызывает даже легкого покраснения. Действие препарата оценивается в 0 баллов. На основании этого можно сделать заключение, что сумма из цист *Artemia* в 0,5 и 5% концентрации не обладает раздражающим действием на слизистую оболочку.

§ 3.3.1.2. Местно-раздражающее действие

Исследование проводили на 30 крысах, массой 140±10г., которым однократно накожно и подкожно в два правых выстриженных участка кожи спины 2х2см, вводили дистиллированную воду (контроль), а в два левых 0,5% и 5,0% раствор субстанции в объеме 0,5мл.

Оценку местного действия осуществляли на основании данных осмотра, проводимого через 4 часа после введения препарата и последующих 7 суток по шкале кожных проб в баллах (таблица 3.12).

Полученные данные показали, что сумма из цист *Artemia* в 0,5% и 5,0 % концентрациях при однократном накожном и подкожном введении не вызывает раздражения, покраснения, отека или других видимых изменений кожи. Действие препарата оценивали 0 баллов.

Полученные результаты показали, что препарат в 0,5% и 5,0% концентрациях не оказывает раздражающего действия на кожу.

При доклиническом изучении специфической токсикологии белковой суммы из цист *Artemia* было выявлено, что сумма не обладает раздражающим действием на слизистую оболочку.

Полученные результаты местно-раздражающего показали, что сумма в 0,5% и 5,0% концентрациях не оказывает раздражающего действия на кожу.

Таблица 3.12

Местно-раздражающее действие белковой суммы из цист *Artemia*

Описание реакции	Оценка в баллах
Эритема и образование спрута	
Отсутствие эритемы	0
Очень слабая эритема (слегка заметная)	1
Заметная эритема	2
Умеренная эритема	3

Выраженная эритема (ярко-красная с образованием спрута)	4
Образование отека	
Отсутствие отека	0
Очень слабый отек (слегка заметный)	1
Заметный отек	2
Умеренный отек	3
Выраженный отек	4
Максимальное количество баллов	8

На основе проведенных фармако-токсикологических исследований компонентов белковой природы цист *Artemia* показано, что препарат относится к IV классу малотоксичных соединений. LD50 - более 5000 мг/кг при пероральном введении на мышах и крысах. Не обладает кумулятивными свойствами, аллергенностью и местно-раздражающим действием. Оказывает стимулирующее действие на иммунную систему у экспериментальных животных, при этом повышается как не специфическая резистентность организма, так и клеточный и гуморальный иммунитет. Обладает выраженными антигипоксическими свойствами, повышая устойчивость мышечной ткани к гипоксии разного генеза. Компоненты не влияют на судорожное действие коразола и стрихнина, увеличивая латентный период и смягчая судорожную активность. Исследование стресс-протекторного действия показало, что компоненты в определенной концентрации увеличивают стресс-протекторный эффект.

Таким образом, на основе компонентов белковой природы цист *Artemia* возможно создание БАДа для спортсменов, подвергающихся большому эмоциональным и физическим нагрузкам и фармпрепаратов, корректирующих обмен веществ.

ГЛАВА 4. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ ПРИРОДНЫХ СОЕДИНЕНИЙ БЕЛКОВОЙ ПРИРОДЫ, БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ И ФАРМАКОТОКСИКОЛОГИИ

§ 4.1.1. Реактивы и оборудование

Соли: NaCl, Na₂SO₄, (NH₄)₂SO₄, Na₂HPO₄, NaH₂PO₄, FeSO₄, NaNO₃, KH₂PO₄, Na₃PO₄, NH₄H₂PO₄, NaHCO₃, MgSO₄, NH₄HCO₃, KCl, NaN₃, CuSO₄, AgNO₃ квалификации х.ч. («Реахим», Россия).

Все реактивы отечественного производства, использованные в работе, имели квалификацию ХЧ или ЧДА: этанол, хлороформ, ацетонитрил для ВЭЖХ, соляная кислота, изопропиловый спирт. Реактивы импортного производства: трифторуксусная кислота (ТФУ) (Merck, Германия).

Буферные растворы для ВЭЖХ:

А: 0,1% ТФУ в H₂O

В: 0,1 % ТФУ в CH₃CN (ацетонитрил)

В работе использовали настольные микроцентрифуги ОПН-3, ОПН-8; лабораторный pH-метр (Mettler Toledo); магнитные мешалки; Лиофильная сушилка (VIRTIS); СФ (Specol); ВЭЖХ (Agilent Technologies 1200); ГХ-МС (Agilent Technologies); Хромато-масс-спектрометр Q-TOF (Agilent Technologies)

Масс-спектры снимали на приборе Micromass MALDI™ (UK).

Обработку данных экспериментов производили на персональном компьютере, на базе процессора Intel® Pentium IV с тактовой частотой 2.4 GHz.

§ 4.1.2. Статистическая обработка полученных результатов

Оценку погрешностей экспериментальных данных проводили, определяя среднее квадратичное отклонение по формуле:

где δ – средняя квадратичная ошибка; n – число измерений;
– отклонение от среднего. Конечный результат выражали как $M \pm m$, M – средняя величина.

В ряде случаев обработку и аппроксимацию (линейную по методу наименьших квадратов, логарифмическую, экспоненциальную или полиномиальную) проводили, используя «мастер диаграмм» электронных таблиц Microsoft Excel 2000 (9.0.2812) из пакета «Microsoft Office 2000 Standard Edition» корпорации Microsoft.

§ 4.2. Методы исследования

§ 4.2.1. Первичная очистка сырья цист Артемии

Процесс промывки цист артемии основан на отделении в рапе по массе цист от тяжелых фракций с дальнейшим выделением легких примесей, всплывающих вместе с цистами, на ситах разной конструкции [136].

§ 4.2.2. Определение размера цист Артемии

Измерения гидратированных цист производили через 2 часа под бинокулярным микроскопом МБС-10 при увеличении 7×12 (цена деления – 10 мкм). Для каждой популяции измеряли по 100 цист [137]

§ 4.2.3. Определение процента выклева

Протестировано два метода определения процента выклева артемии: количественный и «клеточный» методы. При количественном методе цисты вносили в 3 конусные аэрируемые емкости (1,5 л) по 2,7 г цист в каждую. Емкости, заполненные инкубационным раствором, размещали в термостатирующем

контейнере. При «клеточном» методе на 10 смоченных инкубационным раствором разлинованных дисков фильтровальной бумаги наносили в среднем по 200 цист. Чашки Петри помещали в термостатирующий контейнер таким образом, чтобы они соприкасались дном с поверхностью воды. Температура воды на протяжении эксперимента составляла 28 оС. Спустя 24 часа из каждой конусной емкости при помощи автоматической пипетки отбирали по 1 мл инкубационного раствора и фиксировали 4%-м раствором формальдегида. Затем каждую пробу переносили в камеру Богорова и просматривали под бинокулярным микроскопом МБС-10. При «клеточном» методе чашки Петри через 24 часа после постановки на инкубацию просматривали под микроскопом напрямую, не фиксируя материал. После чего определяли средний процент выклева артемии [138].

§ 4.2.4. Определение массовой доли влаги

Массовая доля гигроскопической влаги в сырье определяли путем высушивания образцов при 100-1050С в течение 2 ч. до постоянной массы [139].

§ 4.2.5. Определение общей золы

Массовая доля минеральных веществ определяли сжиганием органических веществ сначала прожигается органических часть в пламени, а потом в муфельной печи при температуре 5000 С в течение 1-2 часов до постоянной массы [106].

§ 4.2.6. Определение общего белка

Массовая доля белка в сырье определяли по методу Кьельдаля [111].

§ 4.2.7. Определение общего жира

Массовую долю жира определяли экстракционным методом в Сокслете по обезжиренному остатку по Госту 13496.15-97 (Методы определения содержания сырого жира). Состав незаменимых жирных кислот определен методом ГХ [140].

§ 4.2.8. Определение углеводов

Определение количества общего сахара фенол-сернокислотным методом предусматривает построение калибровочной кривой по РСО глюкозы. Стандартный раствор глюкозы (1мг/мл) готовили в мерной колбе, растворяя 100мг глюкозы в 50мл H₂O и далее доведя водой до метки (100мл). Методом разбавления исходного раствора были получены растворы разной концентрации для построения калибровочной кривой.

Для определения общего количества сахара фенол-сернокислотным методом к 0,5 мл стандартных образцов глюкозы концентрации 10, 20, 40, 80, 100, 120 мкг/мл и исследуемому раствору добавляли по 0,5мл 5% раствора фенола и 2,5 мл конц. H₂SO₄. Определяли показания светопоглощения оптического прибора (спектрофотометра) при длине волны 480 нм и температуре 100С [141].

§ 4.2.9. Способы получения хитина и хитозана

Процесс удаления белков (депротеинирование) осуществляли при помощи обработки размельченного хитинсодержащего сырья раствором гидроксида натрия. Далее проводили процесс деминерализации в растворе соляной кислоты до полного удаления минеральных солей из сырья. Процесс обесцвечивания (депигментации) проводили с использованием перекиси водорода. Процесс деацетилирования производили путем нагревания сырья

с концентрированным раствором щелочи. Полученный хитозан последовательно промывали водой и метанолом [142].

§ 4.2.10. Определение микро- и макроэлементов

Количественное определение микро- и макроэлементов проводили с помощью метода масс-спектрометрии с индуктивно связанной плазмой (ИСП-МС), позволяющей одновременно определять почти все химические элементы с низкими пределами обнаружения и широким диапазоном концентрации в рамках одного измерения [143].

Навеску сухой пробы исследуемого вещества 0,0500-0,5000 г взвешивали на аналитических весах и помещали в тефлоновые вкладыши, добавляли соответствующие количества очищенных концентрированной минеральной кислоты (азотной кислоты (х/ч) и перекиси водорода (х/ч)). Сосуды помещали в автоклавы, закрывали и ставили на прибор микроволнового разложения Berghof с программным обеспечением MWS-3+. Определяли программу разложения исходя из типа исследуемого вещества, указывали степень разложения и количество автоклавов (до 12 шт).

После разложения содержимое в автоклавах количественно переносили в 50 или 100 мл мерные колбы и доводили объем до метки с 0,5% азотной кислотой.

Анализ исследуемого вещества проводили на приборе – масс-спектрометрии с индуктивно связанной плазмой (ИСП МС). В методе определения указывали оптимальную длину волны определяемых микро- или макроэлементов, при которой они имеют максимальную эмиссию. В построении последовательности анализов указывали количество в мг и степень его разведения в мл. После получения данных, прибор автоматически вычисляет количественное содержание вещества в исследуемом образце и вводит в виде мг/кг или мкг/г с пределами ошибки и RSD в %.

§ 4.2.11. Определение водорастворимых витаминов.

Водорастворимые витамины определяли методом ВЭЖХ [144, С. 315-324] в обращенно-фазовом, ион-парном варианте, в изократическом градиентном со СФ детектированием. Массовую концентрацию витаминов определяли по площади пика при соответствующих длинах волн спектрофотометрического детектирования после введения в хроматографическую систему анализируемых проб и градуировочных растворов.

Для определения градуировочного коэффициента готовили серию калибровочных растворов (не менее 5) тиамина и пиридоксина с концентрациями в интервале от 0,01 до 0,200 мкг/мл, рибофлавина с концентрациями от 0,02 до 0,100 мкг/мл, аскорбиновой кислоты с концентрациями в интервале от 0,01 до 0,200 мкг/мл.

ВЭЖХ- анализ стандартных растворов витаминов и испытуемых образцов проводили на колонке Zorbax SB-C18 (4,6 x 75 мм), 3,5 μ m. Буфер А: 0.05 М раствор KH_2PO_4 , pH-2,5; В: CH_3CN . Программа градиента - 0,6% В 0-0,5мин; 6% В – 4 мин; 30% В – 12 мин, 60% В – 16 мин. Скорость потока 1 мл/мин, поглощение 254 нм и 274 нм.

§ 4.2.12. Определение свободных аминокислот.

Свободные аминокислоты определяли методом ВЭЖХ. Аминокислоты экстрагировали из обезжиренной муки водой, в течение 2 ч, при комнатной температуре. По окончании экстракции, образцы центрифугировали в течение 15 минут при 6000 об/мин. Для избавления от белков и пептидов к экстрактам добавляли равный объем 20% ТХУК. Через 30 минут, белковый осадок удаляли центрифугированием при 6000 об/мин. Далее отбирали супернатант по 0,2 мл и лиофильно высушивали. Предколоночную модификацию аминокислот проводили по методу Кохана [112, 113].

ВЭЖХ анализ фенилтиокарбомойльных (ФТК) производных аминокислот проводили на хроматографе Agilent Technologies 1200 с диодноматричным детектором в градиенте концентрации ацетонитрила. Использовали колонку Discovery HS C₁₈ (75x4.6 мм). Раствор А: 0,14М CH₃COONa + 0,05% ГЭА pH 6,4; В: ацетонитрил. Скорость потока 1,2 мл/мин, оптическое поглощение измеряли при 269 нм. Градиент % В/мин: 1-6%/0-2.5мин; 30%-45мин; 60%-45-50 мин; 0%-55мин.

§ 4.2.13. Определение молекулярной массы белков

Молекулярную массу белков определяли методом Laemmli при 10% ПААГ в денатурированных условиях [146].

§ 4.2.14. Определение аминокислотного состава цист

Гидролиз образца осуществляли по методу [147]. В термостойкую ампулу помещали 50 мкг белковой фракции и к нему добавляли смесь трифторуксусной и соляной кислот (ТФУ:НСl =1:2, об) в количестве 50 мл. Содержимое ампулы замораживали жидким азотом и под вакуумом запаивали ампулу. Затем ампулу выдерживали в термостате при температуре 166oC в течение 1 часа 10 минут. Полученный гидролизат высушивали под вакуумом лиофилизацией.

§ 4.2.14.1. Синтез фенилтиокарбамильных (ФТК)-производных аминокислот

Для получения ФТК-производных аминокислот, брали 200 нмоль образца, высушенного гидролизата белковой фракции, и к нему добавляли 100 мкл раствора, состоящего из ТЭА:CH₃ОН:H₂O (1:7:1 по об). Смесь выдерживали в течение 10 минут при комнатной температуре и высушивали под вакуумом [148].

Реакцией с фенилтиоизоцианатом (ФТИЦ) синтезировали ФТК-производные аминокислот по методу Кохана [112, 113].

§ 4.2.15. Электрофорез в ПААГ

Электрофорез белков в ПААГ проводили в присутствии ДСН по методу Лэммли, описанному в руководстве [146] в приборе для вертикального электрофореза на пластинах толщиной 1 мм. Использовали 10 и 15% гели с содержанием сшивающего агента (N,N'-бисакриламида) до 2% в исходном растворе. ПААГ содержал 0,4 М Трис-НСl, рН 8,8 и 0,1% ДСН, а также в ряде экспериментов – 8 М мочевины. Концентрирующий гель содержал 5% акриламида в 0,4 М Трис-НСl, рН 6,8 и 0,1% ДСН.

Для полимеризации акриламида использовали персульфат аммония и N, N,N',N'-тетраметилдиамин. Электродный буфер содержал 200 мМ Трис-НСl, 0,19 М глицин и 0,1% ДСН. Перед нанесением на гель белки кипятили 3 мин с 1% ДСН и 1% меркаптоэтанола с добавлением бромфенолового синего. Фиксацию и окрашивание белков проводили раствором кумасси R-250 в смеси метанол: уксусная кислота: вода (50:10:40). В качестве маркеров использовали фосфоорилазу В (92 кДа), бычий сывороточный альбумин (68 кДа), овальбумин (45 кДа), карбоксиангидразу (29 кДа), миоглобин (17,8 кДа), цитохром С (12,4 кДа), ингибитор протеаз из сои (6,5 кДа) и инсулин (5,8 кДа). Образцы исследуемых белков наносили в концентрации 1 мг/мл по 30-40 мкл.

§ 4.2.16. Изоэлектрофокусирование

Для изоэлектрофокусирования готовили гель в составе 30% акриламида с бисакриламидом, 40% раствора амфолинов, 15% свежеприготовленного раствора персульфата аммония и воды. Полученную смесь заливали в камеру для вертикального

электрофореза для полимеризации геля. После завершения полимеризации гель переносили в горизонтальную камеру для изофокусирования, избегая появления пузырьков воздуха. Соединяли с термостатом, установленным на температуру 20°C. Одну электродную полосу смачивали раствором 1М H₃PO₄ и помещали на анодный конец геля (маркировка (+) на охлаждающей пластине). Вторую электродную полосу смачивали раствором 1М NaOH и помещали на катодный конец геля (маркировка (□) на охлаждающей пластине). Кусочки фильтровальной бумаги (1 см) замочили 10 мкл раствором гемоглобина (pI=6,9) и по 10 мкл исследуемые наши фракции. Включали напряжение 300 В, сила тока при этом составляла 50 мА. Во время изофокусирования наблюдали концентрирование зон красителей и белков. После завершения фокусировки отключали источник питания, снимали крышку прибора, убирали электроды. Аккуратно, пинцетом удаляли электродные полосы и бумажки с геля. Гель немедленно переносили в емкость с 10 % раствором этанола и выдерживали в течение 30 минут при покачивании, затем фиксирующий раствор удаляли. Гель промывали трижды деионизованной водой, прибавляли окрашивающий раствор по Ригетти и Чиллеми с Кумасси G-250. Оставляли на ночь в краске. Гель отмывали в деионизованной воде. Отмывку проводили до тех пор, пока на прозрачном фоне не станут четко видны полосы после изоэлектрофокусирования. [155, 156]

§ 4.2.17. Трипсинолиз и экстракция белков в геле электрофореза

Необходимые белковые пятна были вырезаны с использованием скальпеля из двумерного геля электрофореза для протеомного анализа. Принадлежащий к одному белку гель был разделен на несколько частей ($\leq 1,5 \times 1,5$ мм) и перенесен в чистую пробирку, предварительно промытую раствором 50% ацетонитрила с 0,1% ТФУК. Для избавления от остатков ДДС-Na, добавляли в

пробирку 100 мкл раствора 40% метанол + 5% уксусной кислоты и инкубировали в течение 15 мин при комнатной температуре. Затем раствор отсасывали, и кусочки геля в пробирке промывали 100 мкл деионизированной водой. Для избавления от красителя Кумасси, добавляли 100 мкл раствора 50 мМ гидрокарбоната аммония в 50% ацетонитриле и инкубировали при 56-60°C в течение 15-20 мин несколько раз до полного обесцвечивания. Прозрачные кусочки геля промывали трижды деионизированной водой. Для восстановления белков в геле добавляли 100 мкл раствора 50-65 мМ DTT в 50 мМ гидрокарбонате аммония и инкубировали в течение 45 мин при комнатной температуре. Раствор отбрасывали и несколько раз промывали деионизированной водой. Для проведения реакции алкилирования добавляли 100 мкл 15-20 мМ раствор йодацетамида в 50-100 мМ гидрокарбонате аммония. Реакции проводили при комнатной температуре в течение 45-60 минут в недоступном для света месте. После окончания реакции гель промывали деионизированной водой несколько раз по 10 минут.

Для проведения трипсинолиза к образцу геля в пробирке добавляли 25 мкл раствора 50 мМ гидрокарбоната аммония и трипсин в соотношении 1:50 к количеству белка в геле и выдержали в течение 10 минут при 40°C. Затем к реакционной смеси добавляли еще одну аликвоту трипсина с тем же буфером и инкубировали в течение 16 часов при 37 оС. По истечении времени реакции трипсин был инактивирован путем добавления 100 мкл 100%-ой муравьиной кислоты. Смесь в пробирке замораживали в жидком азоте и высушивали на лиофильной сушилке.

Для извлечения продуктов трипсинолиза из геля к объему геля добавляли 0,1% раствор трифторуксусной кислоты (20-25 мкл) и экстрагировали на ультразвуковой бане в течение 10 минут. Затем пробирки центрифугировали в течение 12 мин со скоростью 12000 об/мин. Экстракт отделяли в отдельную пробирку и процесс повторяли еще раз с добавлением 0,1 М трифторуксусной кислоты.

Экстракты были объединены и использованы для идентификации белка. [155, 156]

§ 4.2.18. Масс-спектрометрия (Идентификация белков)

Идентификацию белков и частичных аминокислотных последовательностей проводили на масс-спектрометре CHIP-Q-TOF LC-MS Agilent Technologies 6520B. Образцы переносили в масс-спектрометр с использованием Cap Pump Agilent Technologies 1260 при скорости потока 4 мкл/мин в колонке CHIP-ZANO 2-5 мкл Zorbax SB C18, 5 мкм (150 мкм×43 мм) в автосемплере Agilent Technologies Micro WPS. Сорбированные пептиды десорбировали из нано-колонки с использованием Agilent Technologies 1260 Nano Pump при скорости потока 0,6 мкл/мин в градиенте мобильной фазы: А - 0,1% муравьиной кислоты, В - ацетонитрил + 0,1% муравьиной кислоты. Скорость элюции - 0,6 мкл/мин. Градиент в растворе: 5% - 3 мин, 80% - 25-30 минут, 5% - 35 минут. Источник ионизации – интерфейс CHIP; поток газа (N₂) направляющий к сушке – 4 л/минут и температурЕ 350оС; ток скиммерного конуса 65 V, в фрагментаторе 135 V; диапазон определения масс в условиях MS 300-3000 m/z, в условиях MS/MS 50-2400 m/z. Метод ионизации – положительный. Полученные спектры интерпретировали, используя программное обеспечение для анализа масс-спектров Spectrum Mill и MassCot, а также базы данных белков и пептидов NCBI.

§ 4.3. Методы изучения биологических свойств

Опыты на животных проводили в соответствии с правилами «Европейской Конвенции защиты животных, используемых в экспериментах и других научных целях» [149]. Перед постановкой эксперимента животные проходили карантин в течение 10–14 дней [150, 151].

§ 4.3.1. Исследование острой токсичности

Острую токсичность объектов исследования изучали на белых беспородных мышах обоего пола, массой $20 \pm 2,0$ г по 6 животных в каждой группе. Все фармакологические исследования проводили на здоровых половозрелых животных (мышах) прошедших карантин не менее 10-14 дней.

Хитозан вводили перорально в дозах 5000, 6000, 8000 и 10000 мг/кг. Последние 3 дозы вводили дробно с промежутком в 1 час.

О степени токсичности хитозана судили по изменению состояния животных (внешний вид, поведенческая реакция, активность, частота дыхания), наблюдение за которыми продолжалось в течение 14 дней. При работе с животными соблюдались Международные рекомендации по проведению медико-биологических исследований с использованием лабораторных животных. Параметры острой токсичности вычислялись по методу Литчфильда и Уилкоксона [123].

§ 4.3.2. Исследование антигипоксической активности

Антигипоксическое действие исследовали на двух моделях: цитотоксической гемической и нормобарической гипоксии. Эксперимент проводили на 60 белых лабораторных мышах обоего пола массой тела $30 \pm 2,0$ г по 10 животных в группе. Изучаемые вещества экспериментальным мышам вводили перорально в дозах 20, 30, 40, 50 мг/кг за 1 час до начала моделирования гипоксии. Интактной группе животных вводили дистиллированную воду перорально в биоэквивалентном объеме.

Модель цитотоксической гемической гипоксии воспроизводили путем однократного внутрибрюшинного введения нитрита натрия в дозе 400 мг/кг массы тела; модель нормобарической гипоксии с гиперкапнией – помещением крыс в герметичные емкости объемом 250мм³ [152].

§ 4.3.3. Исследование влияния компонентов белковой природы на судорожное действие

Исследование влияния компонентов белковой природы на судорожное действие коразола и стрихнина проводили на белых беспородных мышах массой 20 ± 2 г по 5 в каждой группе. Коразол и стрихнин вводили в дозе 75 мг/кг и 1,2 мг/кг подкожно (контрольная группа). В экспериментальных группах мышам за 1 час до судорожного медиатора вводили соединение белковой природы в дозах 15, 30 и 60 мг/кг перорально, а контрольным дистиллированную воду в соответствующем объеме.

§ 4.3.4. Исследование влияния субстанции на стресс-протекторное действие

Исследование влияния субстанции на стресс-протекторное действие было проведено на белых беспородных мышах массой 20 ± 2 г по 10 в каждой группе. Для экспериментов на мелких лабораторных животных используется модель плавания с грузом до отказа. Данная модель предназначена для определения характеристик активности препарата при нагрузке смешанной мощности (анаэробно-аэробной). Для оценки времени плавания используют емкость из органического стекла размером 20x20x80 см, наполненную водой. Расстояние от воды до емкости не менее 10 см. Исходными показателями работоспособности животных является максимальное время плавания с грузом, масса которого 5% от массы тела при температуре воды в емкости от 29 до 300С. Оцениваемым показателем является время плавания до отказа.

Статистическую обработку полученных данных проводили с определением критерия Стьюдента с помощью статистических программ Windows XP (Excel) [153].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На основании теоретических положений и проведенных экспериментальных исследований были получены следующие результаты:

1. Впервые установлен химический состав цист *Artemia* Аральского моря в сравнении с видами *Artemia* гипергалинных озер Павлодарской области Казахстана и определено, что цисты *Artemia* Аральского моря содержат значительные количества белка, углеводов и липидов, необходимых для роста, развития и созревания культивируемых в искусственных условиях рыб и ракообразных и могут быть использованы в качестве эффективных стартовых кормов.

2. Разработан предварительный документ стандартизации с включением основных органолептических, химических и физико-химических показателей цисты *Artemia* Аральского моря, определяющий технические характеристики сырья.

3. Впервые из цист *Artemia* Аральского моря идентифицирован белок, гомологичный высококонсервативному семейству убиквитиноподобных белков, регулирующий множество биологических процессов.

4. Впервые из цист *Artemia* Аральского моря идентифицированы белки, гомологичные факторам элонгации, актинам и белкам теплового шока, участвующие в различных клеточных функциях и регуляции синтеза белка на раннем этапе развития и в присутствии стрессовых реакций;

5. В результате изучения биологической активности определено, что основные белково-пептидные компоненты из цист *Artemia* Аральского моря обладают иммуностимулирующими и антигипоксическими свойствами, повышая устойчивость к гипоксии разного генеза и могут быть применены в создании пищевых добавок для спортсменов, подвергающихся большим эмоциональным и физическим нагрузкам и фармпрепаратов, корректирующих обмен веществ.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Mirabdullayev, I.M., Joldasova, I.M., Mustafaeva, Z.A., Kazakhbaev, S., Lyubimova, S.A., and Tashmukhamedov, B.A. Succession of the ecosystems of the Aral Sea during its transition from oligohaline to polyhaline water body. *Journal of Marine Systems*. V. 47. 2004. –P. 101–107
2. Мирабдуллаев И.М., Мусаев А.К., Абдуллаева Л.Н., Жуманиезова Н.И. Сукцессия сообществ зоопланктона Аральского моря при переходе от солоноватоводного к гиперсоленому состоянию. Доклады Академии наук Республики Узбекистан №3. 2008 г. –С. 83-85
3. Мирабдуллаев И.М., Мусаев А.К., Жуманиезова Н.И. Новые данные о зоопланктоне Аральское моря. Сборник статей по проблемам рыбного хозяйства Узбекистана. 2006 г. –С. 110-115
4. Жолдасова И.М., Казахбаев С., Ельбаева М.К., Ембергенова У.С., Любимова С.К., Мирабдуллаев И.М. Кардинальные изменения в составе биоты Аральского моря. *Узбек. биол. ж.* №5. 1999 г. –С. 68-70
5. Мирабдуллаев И.М., Жолдасова И.М., Казахбаев С., Любимова С.К., Абдуллаева Л.Н., Туремуратова Г.И. Современное состояние экосистемы Западной части Аральского моря. Проблемы охраны и рационального использования биологических ресурсов водоемов Узбекистана. 2001 г. –С. 74-78
6. Мусаев А., Ханкулиев К., Марден Б., Жуманиезова Н.И., Абдуллаева Л.Н., Мирабдуллаев И.М. Динамика популяции Артемии Аральского моря. Биоразнообразное Узбекистана – Мониторинг и Использование. 2007 г. –С. 177-179
7. Brad Marden, Gilbert Van Stappen, Ablatdyin Musaev, Iskandar Mirabdullayev, Iliya Joldasova, Patrick Sorgeloos. Assessment of the production potential of an emerging *Artemia* population in the Aral Sea, Uzbekistan. *Journal of Marine Systems* 92. 2012 г. –P. 42–52
8. Жолдасова И.М., Казахбав С., Ельбаева М.К., Ембергенова У.С., Любимова С.К., Мирабдуллаев И.М., Обнаружение артемии

в открытой част Аральского моря.//Доклады АН РУз. № 12. 2000 г. –С. 48-50

9. Мирабдуллаев И.М., Мусаев А.К., Мустафаева И.М., Жолдасова И.М., Абдуллаева Л.Н., Темирбеков Р., Марден Б., Ван Стаппен Ж. Сукцессия биоты Аральского моря переходе от олиго-к полигалинному состоянию. Узбекский биологический журнал 2010 г. –С. 66-69

10. Жолдасова И.М., Мусаев А.К., Темирбеков Р.О., Муқанбетқалиева М.М., Есенғалиева И.С. Большое Аральское море- трансграчный «Артемиевый» водоем. Материалы международного научного форума «Биология и биотехнология □□ века» Астана 2014 г. –С. 60-63

11. Мусаев А.К., Мирабдуллаев И.М., Абдуллаева Л.Н. Современное состояние популяции Артемии Аральского моря. Вестник. ККО отделения АН РУз 2008 г. –С. 23-24

12. Persoone G., Sorgeloos P. General aspects of the ecology and biogeography of Artemia // The Brine Shrimp Artemia // eds G. Persoone, P. Sorgeloos, O. Roels and E. Jaspers. — Wetteren, Belgium: Universa Press, Vol. 3. 1980. –P. 3–24

13. Lenz P.H., Dana G.L. Life-cycle studies in Artemia: a comparison between a sub-tropical and a temperate population // Artemia Research and Applications / eds P. Sorgeloos, D.A. Bengtson, W. Declair and E. Jaspers. — Wetteren, Belgium: Universa Press, Vol. 3. 1987. –P. 89–100

14. Sorgeloos P., Lavens P., Leger Ph. Manual for the culture and use of brine shrimp in aquaculture // eds — Belgium: Chent university. 1986. –P. 319

15. Liudmila I. Litvinenko, Aleksandr I. Litvinenko, Elena G. Boiko, Kirill KUTSANOV. Artemia cyst production in Russia. Chinese Journal of Oceanology and Limnology. Vol. 33. 2015. –P. 1436-1450

16. Abatzopoulos T. J., Beardmore J. A., Clegg J. S., Sorgeloos P. Artemia: Basic and Applied Biology. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands. 2002. –P. 286

17. Духовный В.А., Тучин А.И., Ташмухамедов Б.А., Курбанбаев Е., де Шуттер. Южное Припалье – новые перспективы. Ташкент НИЦ МКВК. 2003 г. –С. 154

18. Lavens P., Sorgeloos P., Browne R. A., Trotman C. N.A. Production of *Artemia* in culture tanks // *Artemia biology*. // (Eds). London: CRC Press. 1991. –P. 317–350

19. Motovilov O. K., Poznyakovskiy V. M., Motovilov K. Ya., Latkova E.V. Scientific justification of hydromechanical dispergating in food production from hydrobionts (cyst *Artemia salina*). ISSN 2308-4057. Foods and Raw Materials Vol. 3, No. 1, 2015. –P. 27-32

20. Monroig Ó., Navarro, J., Amat F., González P., Bermejo A., Hontoria F., Enrichment of *Artemia nauplii* in essential fatty acids with different types of liposomes and their use in the rearing of gilthead sea bream (*Sparus aurata*) larvae.

Aquaculture 251, 2006. –P. 491–508.

21. Rafael Tizol-Correa, Laura Carreon-Palau, Bertha O. Arredondo-Vega, Gopal Murugan, Laura Torrentera, Teresita DNJ Maldonado-Montiel, and Alejandro M. Maeda-Martinez. Fatty acid composition of *Artemia* (branchiopoda: anostraca) Cysts from tropical salterns of southern Mexico and Cuba. *Journal of crustacean biology*, 26(4): 2006. P. 503-509

22. Motovilov O.K., Perspektivy ispol'zovaniya dekapulirovannyh cist *Artemia salina* v proizvodstve BAD i komibinirovannyh molochnyh produktov (Prospects of usage of decapsulated *Artemia salina* cysts in the production of BAA and composed milk products), *Rybovodstvo i rybnoe hozjajstvo* (Fish Science and Fish Industry), 2008. –P. 27-35

23. Malandá A., Rønnestadá I., Fyhná H. J., Berg L., Waagbù R. Water-soluble vitamins in natural plankton (copepods) during two consecutive spring blooms compared to vitamins in *Artemia franciscana nauplii* and metanauplii *Marine Biology* 136. 2000. –P. 765-772

24. Langdon C., Nordgreen A., Hawkyard M, Hamre K. Evaluation of wax spray beads for delivery of low-molecular weight, water-

soluble nutrients and antibiotics to *Artemia*. *Aquaculture* 284. 2008. –P. 151–158

25. Asem, A. Historical record on brine shrimp *Artemia* more than one thousand years ago from Urmia Lake, Iran. *J. Biol. Res.* 9. 2008. –P. 113-114.

26. Schlösser, D. Extrait d'une lettre de M. le Docteur Schlosser concernant un insecte peu connu. *Observation periodique sur la physique, l'histoire naturelle et les beaux arts*, de Gautier. 1756. –P. 58-60.

27. Martin, J.W. & G.E. Davis. An updated classification of the Recent Crustacea. *Nat. Hist. Mus. Los Angeles County. Sci. Ser.*, 39: 2001. –P. 1-124.

28. Литвиненко Л.И. Артемия в озерах Западной Сибири / Л.И. Литвиненко, А.И. Литвиненко, Е.Г. Бойко. — Новосибирск: Наука, 2009 г. –С 304.

29. Sorgeloos P., Dhert P., Candreva P. Use of the brine shrimp, *Artemia* spp., in marine fish larviculture. *Aquaculture* 200. 2001. –P. 147–159

30. Сёмик А. М., Ушакова А. О. Современное состояние запасов жаброногого рачка артемии (*Artemia parthenogenetica* L.) В соленых озерах республики крым. ISSN 1026-5643 (print). ISSN 2412-8864 (online). Труды ЮгНИРО, Т. 54 2017 г. –С 137-141.

31. Ковачева Н.П., Литвиненко Л.И., Саенко Е.М., Жигин А.В., Кряхова Н.В., Сёмик А.М. Современное состояние и перспективы развития аквакультуры артемии в России. Труды ВНИРО. Т. 178. 2019 г. –С. 150–171.

32. Веснина Л.В. Состояние популяции галофильного рачка артемии как основа формирования сырьевой базы гипергалинных озер Алтая. Технологии пищевой и перерабатывающей промышленности АПК-продукты здорового питания №4 2020 г. –С. 88-96

33. Chakraborty S., Ghosh U. Oceans: a store of house of drugs-A review. *J Pharm Res*, 3, 2010. –P. 1293-1296

34. Kim S., Wijesekara I. Development and biological activities of marine-derived bioactive peptides: A review. *J Funct Foods*, 2, 2010. –P. 1-9
35. Jamil K., Macrae TH., Clegg JS., et al. A small stress protein act synergistically with trehalose to confer desiccation tolerance on mammalian cells. *Cryobiology*, 51, 2005. –P. 15-28
36. Huang Y., Wang X., Wang H., et al. Studies on mechanism of action of anticancer peptides by modulation of hydrophobicity within a defined structural framework. *Mol Cancer Ther*, 10, 2011. –P. 416-426
37. Jumeri-Kim SM. Antioxidant and anticancer activities of enzymatic hydrolysates of solitary tunicate (*Styela clava*). *Food Sci Biotechnol*, 20, 2011. –P. 1075–1085
38. Abdolkhaleg Deezagi, Azadeh Chashnidel, Neda Vaseli Hagh, Mahvash Khodabandeh Shahraki. The Effects of Purified Artemia Extract Proteins on Proliferation, Differentiation and Apoptosis of Human Leukemic HL-60 Cells. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, Vol 17. 2016. 1539-1545
39. Jheng, Y.-H., Lee, L.-H., Ting, C.-H., Pan, C.-Y., Hui, C.-F., and Chen, J.-Y. Zebrafish fed on recombinant Artemia expressing epinecidin-1 exhibit increased survival and altered expression of immunomodulatory genes upon *Vibrio vulnificus* infection. *Fish Shellfish Immunol*. 42, 2015. –P. 1–15. doi:10.1016/j.fsi.2014.10.019
40. Chen-Hung Ting, Yi-Chun Chen, Jyh-Yih Chen. Nile tilapia fry fed on antimicrobial peptide Epinecidin-1-expressing Artemia cyst exhibit enhanced immunity against acute bacterial infection. *Fish and Shellfish Immunology* 81. 2018. –P. 37–48
41. Pui Ying Chee, Morokot Mang, Ern Sher Lau, Loh Teng-Hern Tan, Ya-Wen He, Wai-Leng Lee, Priyia Pusparajah, Kok-Gan Chan, Learn-Han Lee and Bey-Hing Goh. Epinecidin-1, an Antimicrobial Peptide Derived From Grouper (*Epinephelus coioides*): Pharmacological Activities and Applications. *Front. Microbiol*. 10:2631. 2019. –P. 1-23 doi: 10.3389/fmicb.2019.02631

42. Iryani MTM, MacRae TH, Panchakshari S, Tan J, Bossier P, Wahid MEA. Knockdown of heat shock protein 70 (Hsp70) by RNAi reduces the tolerance of *Artemia francisca nanauplii* to heat and bacterial infection. *J Exp Mar Biol Ecol.* 487: 2017. –P. 106–112
43. Mac Rae TH. Molecular chaperones, stress resistance and development in *Artemia franciscana*. *Sem Cell Dev Biol*14: 2003. –P. 251–258
44. Sun Y, Mansour M, Crack JA, Gass GL, Mac Rae TH. Oligomerization, chaperone activity, and nuclear localization of p26, a small heat shock protein from *Artemia franciscana*. *J Biol Chem* 279: 2004. –P. 399–406
45. Tania S. Villeneuve, Xiaocui Ma, Yu Sun, Mindy M. Oulton, Ann E. Oliver, and Thomas H. Mac Rae. Inhibition of apoptosis by p26: implications for small heat shock protein function during *Artemia* development. *Cell Stress & Chaperones* 11(1), 2006. –P. 71–80
46. Haslbeck M. sHsps and their role in the chaperone network. *Cell Mol Life Sci* 59: 2002. –P. 1649–1657
47. Iryani MTM, MacRae TH, Sorgeloos P, Tengku-Muhammad TS, Danish-Daniel M, Min-Pau T, Satyantini WH, Abd-Wahid ME, Sun J, Lv A, Sung YY. RNA interference of Hsp70 in *Artemia franciscana* nauplii and its effect on morphology, growth, survival and immune response. *Aquaculture* 520. 2020. –P. 1-27
48. MacRae TH. Gene expression, metabolic regulation and stress tolerance during diapause. *J Cell Mol Life Sci* 67: 2010. –P. 2405–2424
49. Allison M. King, Thomas H. MacRae. The small heat shock protein p26 aids development of encysting *artemia* embryos, prevents spontaneous diapause termination and protects against stress. *PLoS One* 7(8): 2012. –P. 1-10 doi.org/10.1371/journal.pone.0043723
50. George M. C. Janssen and Wim Moller Elongation factor 1Py from *Artemia* Purification and properties of its subunits. *Eur. J. Biochem.* 171, 1988. –P. 119-129
51. Z. Yablonka-Reuveni, J.J. Fontaine A. PI. Warner. Distribution of elongation factor 2 between particulate and soluble fractions of

the brine shrimp *Artemia* during early development¹. Department of Biology, University of Windsor, Windsor, Ont., Canada N9B 3B4
Received October 26, 1982. –P. 833-839

52. Slobin L.I. Eukaryotic elongation factor T and artemin: two antigenically related proteins which reflect the dormant state of *Artemia* cysts. In *The Brine Shrimp, Artemia*. Universa Press, Wetteren, Belgium, Vol. 2, 1980. –P. 557–573.

53. Clegg J.S., Jackson S.A. & Popov V.I. Long-term anoxia in encysted embryos of the crustacean, *Artemia franciscana*: viability, ultrastructure, and stress proteins. *Cell Tissue Res.* 301, 2000. –P. 433– 444

54. Chen Q., Neville C., Mac Kenzie A. & Korneluk R. Automated DNA sequencing requiring no DNA template purification. *Biotechniques* 21, 1996. –P. 453–457

55. De Herdt E., De Voeght F., Clauwaert J., Kondo M. & Slegers H. A cryptobiosis-specific 19S protein complex of *Artemia salina* gastrulae. *Biochem. J.* 194, 1981. –P. 9–17

56. Hempstead P.D., Yewdall S.J., Fernie A.R., Lawson D.M., Artymiuk P. J., Rice D. W., Ford G.C. & Harrison P.M. Comparison of the three-dimensional structures of recombinant human H and horse L ferritins at high resolution. *J. Mol. Biol.* 268, 1997. –P. 424–448.

57. Tao Chen, Reinout Amons, James S. Clegg, Alden H. Warner and Thomas H. MacRae. Molecular characterization of artemin and ferritin from *Artemia franciscana*. *Eur. J. Biochem.* 270, 2003. –P. 137–145

58. Bousquet-Antonelli C, Deragon JM. A comprehensive analysis of the La-motif protein superfamily. *RNA*.15(5): 2009. –P. 750–764.

59. Bayfield MA, Yang R, Maraia RJ. Conserved and divergent features of the structure and function of La and La-related proteins (LARPs). *Biochim Biophys Acta*.1799(5–6): 2010. –P. 365–378.

60. MacRae TH. Diapause: diverse states of developmental and metabolic arrest. *J Biol Res.* 3: 2005. –P. 3–14.

61. Clegg JS, Trotman CNA. Physiological and Biochemical Aspect of *Artemia* Ecology. In: Abatzopoulos THJ, Beardmore JA, Clegg JS, Sorgeloos P, editors. *Artemia: Basic and Applied Biology*. Berlin: Kluwer Academic Publishers; 2002. –P. 129–170.
62. Dai JQ, Zhu XJ, Liu FQ, Xiang JH, Nagasawa H, Yang WJ. Involvement of p90 ribosomal S6 kinase in termination of cell cycle arrest during development of *Artemia*-encysted embryos. *J Biol Chem*. 283(3): 2008. –P. 1705–1712.
63. Gajardo GM, Beardmore JA. The brine shrimp *Artemia*: adapted to critical life conditions. *Front Physiol*. 3: 2012. –P. 185.
64. Dian-Fu Chen, Cheng Lin, Hong-Liang Wang, Li Zhang, Li Dai, Sheng-Nan Jia, Rong Zhou, Ran Li, Jin-Shu Yang, Fan Yang, James S. Clegg, Hiromichi Nagasawa and Wei-Jun Yang. An La-related protein controls cell cycle arrest by nuclear retrograde transport of tRNAs during diapause formation in *Artemia*. Chen et al. *BMC Biology* 14:16. 2016. –P. 1-13. DOI 10.1186/s12915-016-0239-4
65. Ellis E.A. Evolutionary ecology of insect immune defences. *Annual Review of Entomology* 50, 2001. –P. 529-551
66. Tassanakajon A., Somboonwiwat K., Supungul P., Tang S. Discovery of immune molecules and their crucial functions in shrimp immunity. *Fish & Shellfish Immunology* 34, 2013. –P. 954-967
67. De Vos S., Bossier P., Van Stappen G., Vercauteren I., Sorgeloos P., Vuylsteke M. A first AFLP-Based Genetic Linkage Map for Brine Shrimp *Artemia franciscana* and its Application in Mapping the Sex Locus. *PLoS ONE* 8 e57585. 2013. –P. 1-10
68. Vanmaele S., Defoirdt T., Cleenwerck I., De Vos P., Bossier P. Characterisation of the virulence of *Vibrios* isolated from a shrimp hatchery, in vitro and in vivo in a gnotobiotic brine shrimp (*Artemia franciscana*) model system. *Aquaculture*, 2015. –P. 28-32
69. Maningas M.B., Kondo H., Hirono I. Molecular mechanisms of the shrimp clotting system. *Fish and Shellfish Immunology* 34, 2013. –P. 968-972

70. Sung Y.Y. & MacRae T.H. Heat Shock Proteins and Disease Control in Aquatic Organisms. *Journal of Aquatic Research Development* S2:006. 2011. –P. 1-10. doi:10.4172/2155-9546.S2-006
71. Rowley A.F. & Pope E.C. Vaccines and crustacean aquaculture – A mechanistic exploration. *Aquaculture* 334-337, 2012. –P. 1-11
72. Hauton C. The scope of the crustacean immune system for disease control. *Journal of Invertebrate Pathology* 110, 2012. –P. 251-260
73. Meng O., Du J., Yao W., Xiu Y., Li Y., Gu W., Wang W. An extracellular copper/zinc superoxide dismutase (ecCuZnSOD) from Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*) and its relationship with *Spiroplasma eriocheiris*. *Aquaculture* 320, 2011. –P. 56-61
74. Smith V.J., Brown J.H., Hauton C. Immunostimulation in crustaceans: does it really protect against infection? *Fish and Shellfish Immunology* 15, 2003. –P. 71-90
75. deBaulny MO., Quentel C., Fournier V., Lamour F., LeGouvello R. Effect of long term oral administration of beta-glucans as an immunostimulant or an adjuvant on some non-specific parameters of the immune response of turbot *Scophthalmus maximus*. *Diseases of Aquatic Organisms* 26, 1996. –P. 139-147
76. Meena D. K., Das P., Shailesh Kumar S.C., Mandal A. K., Prusty S. K., Singh M. S., Akhtar B., Behera K., Kumar K., Pal A.K., Mukherjee S.C. Beta-glucan: an ideal immunostimulant in aquaculture (a review). *Fish physiology and biochemistry* 39, 2013. –P. 431-457
77. Sych G., Frost P., Irnazarow I. Influence of β -glucan (Macrogard®) on innate immunity of carp fry. *Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy* 57, 2013. –P. 219-223
78. Sajeevan T.P., Philip R., Singh B.I.S. Dose/frequency: a critical factor in the administration of glucan as immunostimulant to Indian white shrimp *Fenneropenaeus indicus*. *Aquaculture* 287, 2009. –P. 248- 252
79. Marques A., Dhont J., Sorgeloos P., Bossier P. Immunostimulatory nature of β -glucans and baker's yeast in gnotobiotic *Artemia* challenge tests. *Fish and Shellfish Immunology* 20, 2006. –P. 682-692

80. Soltanian S., Francois JM., Dhont J., Arnouts S., Sorgeloos P., Bossier P. Enhanced disease resistance in *Artemia* by application of commercial beta-glucans sources and chitin in a gnotobiotic *Artemia* challenge test. *Fish and Shellfish Immunology* 23, 2007. –P. 1304-1314
81. Sorgeloos P. The use of *Artemia* in aquaculture // *The brine shrimp Artemia*. –Wetteren Univ. press –Vol. 3. 1980. –P. 25-46
82. Sorgeloos P. Potential of the mass production of the brine shrimp *Artemia* // *J.Soc. Underwat. Technol.* -9 N 1. 1983. –P. 27-30
83. Schauer P.S., Jons D.M., Olney Ch. E., Simpson K.L. International study on *Artemia*. □. Lipid level, energy content and fatty acid composition of the cysts and newly hatched nauplii from five geographical strains of *Artemia* // *The brine shrimp Artemia*. –Wetteren Univ. press –Vol. 3. 1980. –P. 365-373
84. Руднева И.И. *Артемия. Перспективы использования в народном хозяйстве*. Киев: Наук. думка, 1991 г. –С. 140.
85. Van Mater D., Kolligs F. T., Dlugosz A. A., and Fearon E. R. Transient activation of β -catenin signaling in cutaneous keratinocytes is sufficient to trigger the active growth phase of the hair cycle in mice, *Genes Develop.*, 17. 2003. –P. 1219–1224
86. Finamore F. J. and Warner A. H. The occurrence of p1, p4-diguanosine 5'-tetraphosphate in brine shrimp eggs, *J. Biol. Chem.*, 238. 1963. –P. 344–348
87. Warner A. H. and Finamore F. J. Isolation purification and characterization of p1, p4-diguanosine 5'-tetraphosphate asymmetrical-pyrophosphohydrolase from brine shrimp eggs, *Biochem.*, 4(8). 1965. –P. 1568–1575
88. Warner A. H. and Clegg J. S. Diguanoside nucleotide metabolism and the survival of *Artemia* embryos during years of continuous anoxia, *Eur. J. Biochem.*, 268. 2001. –P. 1568–1576
89. Rapaport E. and Zamecnik P. C. Presence of diadenosine 5',5'''-p1, p4-tetraphosphate (Ap4A) in mammalian cells in levels varying widely with proliferative activity of the tissue: A possible positive

“pleio-typic activator,” *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 73(11). 1976. –P. 3984–3988

90. Fort-Lacoste L. and Jeanjean M. Association de diguanoside tetraphosphateet de dérivés nicotiniques, destinées aux traitement des désordres capillaries, notamment pour lutter contre la chute de cheveux. *Eur. Pat. Offi ce*. 2003. EP 1 336 402 A1

91. Divinomar Severino, Telma M.T. Zorn, Gustavo A. Micke, Ana C. O. Costa, José Roberto M.C. Silva, Leandro F. Nogueira, Alica J. Kowaltowski, And Maurício S. Baptista. Diguanoside tetraphosphateet (Gp4G) is an epithelial cell and hair growth regulator. *J. Cosmet. Sci.*, 62. 2011. –P. 469–482

92. Duarte CM., Marba N., Holmer M. Rapid domestication of marine species. *Science* 316. 2007. –P. 382–383.

93. Lavens P., Sorgeloos P. The history, present status and prospects of the availability of *Artemia* cysts for aquaculture. *Aquaculture* 181. 2000. –P. 397–403.

94. Endebu M., Miah F., Boon N., Catania F., Bossier P., Van Stappen G. Historic occurrence of parthenogenetic *Artemia* in Great Salt Lake, USA, as demonstrated by molecular analysis of field samples. *Journal of Great Lakes Research* 39. 2013. –P. 47–55.

95. Субботина О. В. Эффективность различных доз цист артемии при выращивании цыплятбройлеров: дис.к.с.-х.н. Барнаул, 2003 г. –С. 2.

96. Мальцев А. Б., Мальцева Н. А. Использование цист артемии при выращивании цыплятбройлеров // Матер. XVI конф. // ВНАП. Сергиев Посад. 2009 г. –С. 117–119.

97. Ли С. С., Кнорр А. Ф. Эффективность использования цист артемии в кормлении различных видов сельскохозяйственных животных и птицы // Вестник Государственного Алтайского Университета. № 1. 2006 г. –С. 56

98. Мальцев А. Б., Мальцева Н. А., Спиридонов И. П., Давыдов В. М. Нетрадиционные корма и кормовые добавки для птицы. Омск: Областная типография, 2005 г. –С. 704

99. Руднева И., Щепкина А. Химический состав цист артемии из различных источников. Рыбное хозяйство. ВО Агропромиздат №5' – Москва. 1990г. –С. 96

100. К.Г. Хажигаев, Г.Е. Бердимбетова, Ю.И. Ощепкова. Сравнительное изучение общего химического состава расы артемии. Проблемы рационального использования и охрана природных ресурсов южного приаралья” Сборник материалов. Часть 2. г. Нукус, 17-18- июля 2018г. –С. 33-34

101. Оразова С.Б., Шарапова Л.И., Кайрат Б.К., Сержанова С.С., Омирбекова Н.Ж. Биохимический анализ биомассы рачка *Artemia* sp. И его цист из популяций некоторых соляных озер павлодарской области. Казахский национальный университет имени АЛЬ-ФАРАБИ. Вестник. Серия биологическая. №4 (73). 2017 г. –С. 105-113

102. Антипова Л.В., Глотова И.А., Рогов И.А. Методы исследования мяса и мясных продуктов. – Москва: Колос, 2001 г. – С. 376

103. К.Г. Хажигаев, У.Ж. Ишимов, Ю.И. Ощепкова, Г.Е. Бердимбетова. «Определение свободных аминокислот цисты артемии Аральского моря». в международной конференции молодых ученых «Наука и инновации» СПТ. г. Ташкент. 2019 г. –С. 299-300

104. К.Г. Хажигаев, Ю.И. Ощепкова, Г.Е. Бердимбетова. Орол денгизи *Artemia parthenogenetica* цистасининг оксил ва ёғдорлигини ўрганиш. Научная конференция молодых ученых «актуальные проблемы химии природных соединений» посвященная 110-летию со дня рождения академика Сабира Юнусовича Юнусова» Тшкент 2019 г. –С. 153

105. Веснина Л. В., Ронжина Т. О. Методика контрольного взвешивания цист рачка *Artemia* Leach, 1819 и корректировка квоты их вылова с учетом фактической влажности и чистоты биосырья: метод. указания / Новосиб. гос. аграр. ун-т, сост.: – Новосибирск: ИЦ «Золотой колос», 2014 г. –С. 32.

106. Khajibayev Q.G, Olimjonov Sh.S., Ochepkova Y.I, Berdimbetova G.E. Determination of the quality and chemical composition of the Aral Sea Artemia cysts. Наука и образование в Каракалпакстане Каракалпакского Государственного Университета им. Бердаха. Нукус № 4. 2018 г. –С 22-27

107. Abatzopoulos T., Baxevanis A., Triantaphyllidis G., Criel G., Pador E., Van Stappen, G. Sorgeloos P. Quality evaluation of Artemia urmiana Gunther (Urmia lake, Iran) with special emphasis on its particular cyst characteristics. Aquaculture. Vol. 254. 2006. –P. 442-454

108. Мусаев А.К., Абдурахимова А.Р., Мирабдуллаев И.Б. Качество цист Артемии Аральского моря. Вестник ККО АН РУз, №1. 2012 г. –С. 62-64

109. ГОСТ 2.114 -95. Межгосударственный стандарт. Единая система конструкторской документации технические условия. Российской Федерации с 1 апреля 2017 г.

110. ГОСТ 23637-90 Сенаж. Технические условия. Москва. 2003 г.

111. К.Г. Хажибаев, Г.Е.Бердимбетова, М.Б.Артиков, Д.С.Садыков. Artemia parthenogenetica цистаси таркибидаги оксилларни ажратиб олиш ва малекуляр массасини аниқлаш. Международной научно-теоретической конференции «Актуальные вопросы естественных наук» Нөкис 2020 г. –С 354-356

112. К.Г. Хажибаев, Г.Е. Бердимбетова, У.Ж. Ишимов, Ю.И. Ощепкова, академик АН РУз Ш.И. Салихов. Количественное определение общего белка и свободных аминокислот цисты Артемии Аральского моря. Журнала «Доклады Академии наук Республики Узбекистан» Академии наук г. Ташкент №3. 2019 г. –С 54-58.

113. К.Г. Хажибаев, Г.Е. Бердимбетова, Б.П. Карлыбаева, Ю.И. Ощепкова, У.Ж. Ишимов. «Определение аминокислот буфер растворимых белков цисты артемии Аральского моря». Химия и химическая техноогия. г. Ташкент. №4. 2019 г. –С 64-68

114. ГОСТ 26657-97 Корма, комбикорма, комбикормовое сырье. Методы определения содержания фосфора. 1999 г.

115. Слепян, Ивановна Л.К., Евгеньевна И.Г., Николаевна О.П., Сергеевна Н.В., Александровна М.Я., Владимировна М., Шантырь И.И. Биоэлементы в листьях тропических лекарственных растений *Polyscias filicifolia* (Moore ex Fournier) Bailey (Araliaceae), *Ginkgo biloba* L (Ginkgoaceae) и биологически активных добавок// butlerov.com © Butlerov Communications. Vol.37. No.3. 2014 г. –P.79-84

116. К.Г. Хажибаев, Г.Е. Бердимбетова, Б.П. Карлыбаева, Ю.И. Ощепкова. Изучение макро и микронутриентов цист артемии Аральского моря. *Universum: химия и биология*. Выпуск: 9(63) Москва 2019 г. –С 19-24.

117. Литвиненко Л.И., Мамонтов Ю.П., Иванова О.В., Литвиненко А.И., Чебанов М.С. Инструкция по использованию артемии в аквакультуре. Тюмень. 2000 г. –С. 59.

118. Бендрышев А.А., Пашкова Е.Б., Пирогов А.В., Шпигун О.А. Определение водорастворимых витаминов в витаминных премиксах, биологически - активных добавках и фармацевтических препаратах методом ВЭЖХ с градиентным элюированием// *Вестн. Моск. Ун-та. Сер. 2. Химия*. Т. 51. №4. 2010 г. –С. 315-324

119. A Hershko, A Ciechanover The ubiquitin system// *Annual Review of Biochemistry* 67. 1998. –P. 425–479. doi.org/10.1146/annurev.biochem.67.1.425

120. Xu P, Duong DM, Seyfried NT, Cheng D, Xie Y, Robert J, Rush J, Hochstrasser M, Finley D, Peng J. Quantitative proteomics reveals the function of unconventional ubiquitin chains in proteasomal degradation *Cell* 137(1) 2009. –P. 133–145 <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.01.041>

121. Macrae I, Zhou K., Li F., Repic A., Brooks A., Cande W., Adams P., Doudna J. Structural basis for double-stranded RNA processing by Dicer (англ.) // *Science: journal*. Vol. 311, no. 5758. 2006. –P. 195-198. doi:10.1126/science.1121638.

122. Jaronczyk K., Carmichael J., Hobman T. Exploring the functions of RNA interference pathway proteins: some functions are more RISCy than others? (англ.) // *Biochem J: journal*. Vol. 387, no. Pt 3. 2005. –P. 561-571. doi:10.1042/BJ20041822.

123. Tallarida R.J., Murray R.B. Litchfield and Wilcoxon I: Confidence Limits of ED50 // *Manual of Pharmacologic Calculations*. –V. 1. 1987. –P. 153-159.

124. Прозоровский, К.В. Экспресс метод определения средних эффективных доз токсических веществ/ К.В. Прозоровский - Фармакология и токсикология, №6. 1983 г. –С. 91-94

125. Кост, Е.А. Справочник по клиническим лабораторным методам исследования/ Е.А.Кост – Москва. 1975 г. –С 360

126. Балуда, В.П. Лабораторные методы исследования системы гемостаза. – Томск. 1980 г. –С. 314

127. Меерсона Ф.З. Адаптация к периодической гипоксии в терапии и профилактике /под ред. - М.: Наука, 1989 г. –С 70

128. Гаркави, Л.Х., Квакина Е.Б., Уколова М.А. Адаптационные реакции и резистентность организма // Ростов-наДону: РГУ. 1990 г. –С. 224

129. Горанчук В.В., Гипокситерапия / В.В. Горанчук, Н.И. Сапова, А.О. Иванов. - СПб.: ЭЛБИ-СПб. – 2003 г. –С. 536

130. Nyakas C., Buwalda B., Luiten P.G.M. Hypoxia and brain development. // *Progress in Neurobiology*. - Vol. 49. 1996. –P. 1-51

131. Иванов К.П. Гипоксия мозга и гибель нейронов вследствие нарушения микроциркуляции в мозге и регионального мозгового кровообращения. // Регионарное кровообращение и микроциркуляция. - № 2. 2010 г. –С. 5-17

132. Анисимов В.Н. Генетический и эпигенетический контроль продолжительности жизни. Канцерогенез и старение. // Генетика продолжительности жизни и старения: материалы Международной конф. Сыктывкар. 2010 г. –С. 4–5

133. Малкова, Я.Г. Использование различных моделей

гипоксии в экспериментальной фармакологии. Я.Г.Малкова – Молодой ученый. №3. 2010 г. –С. 318-319

134. Основы медицинской статистики/ Учебно-методическое пособие – Санкт-Петербург. 2014 г. –С. 1-32

135. Методические рекомендации по оценке аллергенных свойств фармакологических средств. – Москва. 1988 г. –С 12-13

136. Веснина Л.В. Оценка качества цист рачка Артемии в гипергалинных озерах Алтайского края. «Вестник НГАУ» № 4 (37). 2015 г. –С. 69-73

137. Старовойтова Д.А., Бурмистрова О.С. Размеры цист популяций артемии разнотипных озер кулундинской низменности. Известия АО РГО. № 4 (47). 2017 г. –С. 84-92

138. Кряхова Н.В., Ковачева Н.П. Методические аспекты инкубации цист артемии. материалы IV национальной научно-практической конференции, Калининград – 8-10 октября 2019 г. –С. 149-153

139. Е.А. Морозова, А.Л. Верещагин, М.В. Хмелев. Обессоливание хорионов цист *artemia species*. Ползуновский вестник № 1-2 2008. –С. 82-84

140. Soyibjon S. Bozorov, Nodir Sh. Berdiev, Uchkun J. Ishimov, Shukhratjon S. Olimjonov, Jamolitdin F. Ziyavitdinov, Akmal M. Asrorov and Shavkat I. Salikhov. Chemical composition and biological activity of seed oil of amaranth varieties. Nova Biotechnol Chim 17(1): 2018. –P. 66-73 DOI: 10.2478/nbec-2018-0007

методу Кохана. Dubois M., Gilles K.A., Hamilton J., Robers P.A., Smith F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances// Analyt. Chem. V.28. 1956. –P. 350-356

142. Курченко В.П., Буга С.В., Петрашкевич Н.В., Буткевич Т.В., Ветошкин А.А., Демченков Е.Л., Лодыгин А.Д., Зуева О.Ю., Варламов В.П., Бородин О.И. Технологические основы получения хитина и хитозана из насекомых. Труды БГУ том11, часть 1. 2016 г. –С. 110-126

143. Смирнова Е. В., Зарубина О. В. Определение Макро-

и микроэлементов в биологических стандартных образцах растительного и животного происхождения методом масс-спектрометрии с индуктивно связанной плазмой// Стандартные образцы №3 2014 г. –С. 45-57.

144. Бендрышев А.А., Пашкова Е.Б., Пирогов А.В., Шпигун О.А. Определение водорастворимых витаминов в витаминных премиксах, биологически - активных добавках и фармацевтических препаратах методом ВЭЖХ с градиентным элюированием// Вестн. Моск. Ун-та. Сер. 2. Химия. Т. 51. №4 2010 г. –С. 315-324

145. Н.Н. Типсина, Т.Ф. Варфоломеева. Расчет пищевой ценности хлебобулочных и кондитерских изделий. Электронное издание Красноярск 2016 г. –С 41.

146. Laemmli U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // Nature. – Vol.227. 1970. – P. 680–685.

147. J. Csap'ó, Zs. Kiss-Csap'ó, Cs. Albert, K. L'oki. Hydrolysis of proteins performed at high temperatures and for short times with reduced racemization, in order to determine the enantiomers of D- and L-amino acids Acta Univ. Sapientiae, Alimentaria, 1. 2008. –P. 31–48

148. Ramon Checa-Moreno, Eloisa Manzano, Gloria Miron, Luis Fernn Capitrn-Vallvey. Revisitation of the phenylisothiocyanatederivatives procedure for amino acid determination by HPLC-UV. J. Sep. Sci. 31, 2008. –P. 3817 – 3828

149. Европейская конвенция «О защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях». Страсбург. 1986 г. –С. 1-13

150. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ /Под общей редакцией чл.-корр. РАМН проф. Р. У. Хабриева. – 2-изд., перераб. и доп. – М.: Медицина, 2005 г. –С. 832

151. Сернов Л. Н. Элементы экспериментальной фармакологии / Л. Н. Сернов, В. В. Гацура. – М.: ВНИЦ БАВ, 2000 г. –С. 352

152. Лукьянова Л.Д. Методические рекомендации по скринингу

и доклиническому испытанию антигипоксических средств. – М., 1989 г. –С. 12

153. Миронова А.Н. Методические рекомендации по статистической обработке результатов доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая. // Под ред. – М. 2012 г. –С. 944

154. Курицына Е.М. Биологическая ценность белков и количество минеральных веществ мяса цыплят-бройлеров, выращенных с применением в рационе цист артемий / М.В. Заболотных, Е.М. Курицына, А.Б. Мальцев, О.А. Ядрищенская //Актуальные вопросы ветеринарной медицины: материалы IIIV Сибирской ветеринарной конференции. - Новосибирск, 2008.-С. 201-205

155. Nodir Sh. Berdiev, Jamolitdin F. Ziyavitdinov, Akmal M. Asrorov, Shukhratjon S. Olimjonov, Shavkat I. Salikhov Characterization of a novel lipase from *Pseudomonas aeruginosa* // Nova Biotechnologica et Chimica. – 2019. – 18(1). P.44–51.

156. Бердиев Н.Ш., Зиявитдинов Ж.Ф., Бозоров С.С., Ишимов У.Ж., Олимжонов Ш.С., Фазлиддинов Ш.Ж., Салихов Ш.И. Первичная структура липаз бактерии *Pseudomonas aeruginosa* A12 //Доклады Академ Наук. – 2019. № 3. – С. 43-48.

СПИСОК ЕДИНИЦ, СИМВОЛОВ И ТЕРМИНОВ

ВЭЖХ	–	Высокоэффективная жидкостная
хроматография		
БАД	–	Биологически активная добавка
Бтш (Hsp)	–	Белок теплового шока
РНК	–	Рибонуклеиновая кислота
мРНК	–	Матричная рибонуклеиновая кислота
ДНК	–	Дезоксирибонуклеиновая кислота
АТФ	–	Аденозин трифосфатаза
ТУ	–	Технические условия
ЛД50	–	Летальная доза вещества (мг/кг), вызывающая
гибель половины членов испытываемой группы		
АлАТ	–	Аланин-аминотрансфераза
АсАТ	–	Аспарта-аминотрансфераза
ИСП-МС	–	Масс-спектрометрия с индуктивно-связанной
плазмой		
ОЭС-ИСП	–	Опτικο-эмиссионная спектрометрия с индуктивно-связанной плазмой
ADF	–	Актин-деполимеризующий фактор

СОДЕРЖАНИЕ

Введение	3
----------------	---

Глава 1. Перспективы использования цист артемии в пищевой промышленности и сельском хозяйстве

§ 1.1. Причины размножения популяции артемии в аральском море	5
§ 1.2. <i>Artemia salina</i> – заселенность и биологическая активность.	7
§ 1.3. Общая характеристика рода артемии	10
§ 1.4. Биологическая активность некоторых соединений белковой природы цист артемии.....	12
§ 1.5. Применение цист артемии.....	23

Глава 2. Выделение и физико-химическая характеристика соединений белковой природы цист артемии аральского моря

§ 2.1. Изучение общего химического состава цист <i>artemia</i>	28
§ 2.4. Получение липидной и белково-пептидной фракций цист <i>artemia</i>	44
§ 2.4.1. Подбор экстрагента для получения липидной фракции....	45
§ 2.4.2. Выделение белков и их очистка.....	48
§ 2.4.2.1. Идентификация белков и пептидов из цисты артемии...50	

Глава 3. Биологическая активность соединений белковой природы цист артемии Аральского моря

§ 3.1. Доклиническое исследование общей токсикологии соединений белковой природы цист <i>artemia</i> аральского моря	64
§ 3.1.1. Изучение острой токсичности	64
§ 3.1.3. Изучение хронической токсичности соединений белковой природы цист <i>artemia</i>	66
§ 3.1.3.1. Результаты исследования состава периферической крови крыс под влиянием соединений белковой природы Цист <i>artemia</i>	68
§ 3.1.3.3. Функциональное состояние печени крыс при хроническом	

введении соединений белковой природы цист artemia в течение 10 дней	70
§ 3.1.3.4. Изучение интегральных показателей у подопытных животных.....	71
§ 3.2. Доклиническое изучение специфической фармакологии соединений белковой природы цист artemia	72
§ 3.2.1. Изучение влияния соединений белковой природы цист artemia на количество клеток паренхиматозных органов и макрофагов в перитонеальной жидкости	72
§ 3.2.3. Влияние соединений белковой природы цист artemia.....	80
На судорожное действие коразола	80
§ 3.2.4. Влияние соединений белковой природы цист artemia на судорожное действие стрихнина.....	82
§ 3.2.5. Влияние соединений белковой природы цист artemia на стресс-протекторное действие	83
§ 3.3. Доклиническое изучение специфической токсикологии соединений белковой природы цист artemia.....	85
§ 3.3.1. Местно-раздражающее действие соединений белковой природы цист artemia	85
§ 3.3.1.1. Конъюнктивальная проба.....	85
§ 3.3.1.2. Местно-раздражающее действие	86

Глава 4. Материалы и методы исследования природных соединений белковой природы, биологической активности и фармакотоксикологии

§ 4.1.1. Реактивы и оборудование	88
§ 4.1.2. Статистическая обработка полученных результатов.....	88
§ 4.2. Методы исследования.....	89
§ 4.2.1. Первичная очистка сырья цист артемии	89
§ 4.2.2. Определение размера цист артемии	89
§ 4.2.3. Определение процента выклева	89
§ 4.2.4. Определение массовой доли влаги	90

§ 4.2.5. Определение общей золы	90
§ 4.2.6. Определение общего белка	90
§ 4.2.7. Определение общего жира	91
§ 4.2.8. Определение углеводов	91
§ 4.2.9. Способы получения хитина и хитозана	91
§ 4.2.10. Определение микро- и макроэлементов	92
§ 4.2.11. Определение водорастворимых витаминов	93
§ 4.2.12. Определение свободных аминокислот	93
§ 4.2.13. Определение молекулярной массы белков	94
§ 4.2.14. Определение аминокислотного состава цист	94
§ 4.2.14.1. Синтез фенилтиокарбамильных (фтк)-производных аминокислот	94
§ 4.2.15. Электрофорез в пааг	95
§ 4.2.16. Изоэлектрофокусирование	95
§ 4.2.17. Трипсинолиз и экстракция белков в геле электрофореза	96
§ 4.2.18. Масс-спектрометрия (идентификация белков)	98
§ 4.3. Методы изучения биологических свойств	98
§ 4.3.1. Исследование острой токсичности	99
§ 4.3.2. Исследование антигипоксической активности	99
§ 4.3.3. Исследование влияния компонентов белковой природы на судорожное действие	100
§ 4.3.4. Исследование влияния субстанции на стресс-протекторное действие	100
Заключение	101
Список использованной литературы	102
Список единиц, символов и терминов	120

ХОЖИБАЕВ К. Г., БЕРДИМБЕТОВА Г.Е.,
ОЩЕПКОВА Ю.И., САТИМОВА М.Р.

ХИМИЧЕСКИЙ СОСТАВ И БИОЛОГИЧЕСКИЙ АКТИВНОСТЬ СОЕДИНЕНИЙ БЕЛКОВОЙ ПРИРОДЫ ЦИСТ АРТЕМИИ АРАЛЬСКОГО МОРЯ

НУКУС – «AVANGARD-BASPA» – 2024

Редактор *Е. Исаков*
Худ.редактор *И. Сержанов*
Тех.редактор *Н. Қайыпбергенова*
Оператор *А. Атагуллаева*

Подготовлено к печати с оригинал-макетта: 20.12.2024. Формат бумаги
60х84¹/₁₆. Кегль 12. Гарнитура: «Times New Roman». Офсетная печать.
Объем 7,75 п.л. Тираж 100 штук. Заказ №.

Издательство «AVANGARD-BASPA», 230100, город Нукус,
Проспект И. Каримова, 111-дом.
Отпечатано в типографии «NUR TURAN PRINT» г.Нукус, ул Зыялы 40.