Вищий державний навчальний заклад України
«Українська медична стоматологічна академія»
Українська Академія наук національного прогресу

Проблеми екології та медицини

Том 13 №5-6 2009

НАУКОВО-ПРАКТИЧНИЙ ЖУРНАЛ *Заснований в 1997 році*

Виходить 1 раз на 2 місяці

Зміст

С Т А Т Т І

ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА МЕДИЦИНА

РОЛЬ ПОЛІМОРФІЗМУ TOLL-ПОДІБНОГО РЕЦЕПТОРА 4 ASP299GLY У РОЗВИТКУ БАКТЕРІАЛЬНИХ ІНФЕКЦІЙ, ЩО ПЕРЕДАЮТЬСЯ СТАТЕВИМ ШЛЯХОМ
Ізмайлова О. В., Шликова О. А., Боброва Н.О., Кайдашев І. П. **3**

ВПЛИВ ФУЛЕРЕНІВ НА РОЗВИТОК АЛЕРГІЧНОГО ЗАПАЛЕННЯ В ЕКСПЕРИМЕНТІ
Куценко Н.Л., Микитюк М.В., Боброва Н.О., Кайдашев І.П. **6**

ДОСЛІДЖЕННЯ ХРОМАТОГРАФІЧНОГО СПЕКТРУ ПЕПТИДНОГО КОМПЛЕКСУ, ОТРИМАНОГО ІЗ СТЕГНОВИХ М'ЯЗІВ ЩУРІВ
Весніна Л.Е., Солохіна І.Л. **12**

КЛІНІЧНА МЕДИЦИНА

ПОЛИМОРФИЗМ ГЕНА TOLL-LIKE РЕЦЕПТОРА 4 ASP299GLY У БОЛЬНЫХ РЕВМАТОИДНЫМ АРТРИТОМ
Белоглазова К.В., Шлыкова О.А., Измайлова О,В. Кайдашев И.П. **15**

ПРО12АЛА ПОЛИМОРФИЗМ PPAR Г2 И СЕНИЛЬНАЯ ДЕМЕНЦИЯ
Расин С.М., Шлыкова О.А., Расин М.С. Кайдашев И.П. **18**

ІНТЕГРАТИВНА МОРФОЛОГІЯ

МОРФОЛОГІЧНІ ОСОБЛИВОСТІ ПЛОСКОКЛІТИННОГО РАКУ ГОРТАНІ БЕЗ ОРОГОВІННЯ
Гасюк Ю.А. **22**

ЕКОЛОГІЧНІ АСПЕКТИ

ПРИНЦИПЫ И МЕРЫ ПЕРВИЧНОЙ ПРОФИЛАКТИКИ БОЛЕЗНЕЙ СИСТЕМЫ КРОВООБРАЩЕНИЯ
Ищейкина Ю.А. ***26***

ВИКОРИСТАННЯ КИСНЕВИХ КОКТЕЙЛІВ ЯК ЗАСОБУ ПРОФІЛАКТИКИ ХВОРОБ ОРГАНІВ ДИХАННЯ У ДІТЕЙ
Саргош О.Д., Лисак В.П., Четверикова О.П., Римар М.П., Катрушов О.В. ***31***

МЕДИКО-СОЦІАЛЬНІ ТА СОЦІАЛЬНО-ІСТОРИЧНІ ПЕРЕДУМОВИ СТАНОВЛЕННЯ ГІҐІЄНИ ВИХОВАННЯ ТА РОЗВИТКУ ШКІЛЬНОЇ ГІҐІЄНИ ЯК НАУКИ В УКРАЇНІ НА ПОЧАТКУ XX СТОЛІТТЯ
Стельмахівська В.П. ***34***

НЕКРОЛОГ

ПАМ'ЯТІ ПРОФЕСОРА НАТАЛІЇ МИКОЛАЇВНИ ГРИЦАЙ

данова, Н. И. Мартиросова [и др.] // Фізіологічний журнал. – 2008. – Т. 54, № 6. – С. 87-99.
4. Роль и биологическое значение Толл-подобных рецепторов в антиинфекционной резистентности организма / А. Л. Байракова, Е. А. Воропаева, С. С. Афанасьев [и др.] // Вестн. Рос. АМН. – 2008. - № 1. – С. 45-54.
5. Симбирцев А. С. Толл-белки: специфические рецепторы неспецифического иммунитета / А. С. Симбирцев // Иммунология. – 2005. - № 6. – С. 368-377.
6. Сухих Г. Т. Иммунология беременности / Г. Т. Сухих, Л. В. Ванько. – М. : Издательство РАМН, 2003. – 400 с.
7. Толстопятова М. А. Роль рецепторов врожденного иммунитета в развитии инфекционной патологии у новорожденных детей / М. А. Толстопятова, Г. А. Буслаева, И. Г. Козлов // Педиатрия. – 2009. – Т. 87, № 1. – С.115-120.
8. Хаитов Р.М. Роль паттернраспознающих рецепторов во врожденном и адаптивном иммунитете / Р. М. Хаитов, М. В. Пащенков, Б. В. Пинегин // Иммунология. – 2009. - № 1. – С. 66-76.
9. Хилл Б.А. Основы медицинской статистики / Б. А. Хилл ; пер. с англ. – М. : Медгиз, 1958. – 306 с.
10. Яглова Н.В. Тучные клетки и врожденный иммунитет / Н. В. Яглова // Иммунология. – 2009. - № 2. – С.139-143.
11. Candida-specific IFN-gamma deficiency and toll-like receptor polymorphisms in patients with chronic mucocutaneous candidiasis / C. A. Van der Graaf, M. G. Netea, S. A. Morre [et al.] // J. Eur. Cytokine Netw. – 2006. - Vol. 17 (1). – P. 29.
12. Deficient host-bacteria interactions in inflammatory bowel disease? The toll-like receptor (TLR)-4 Asp299Gly polymorphism is associated with Crohn's disease and ulcerative colitis / D. Franchimont, S. Vermeire, H. Housni [et al.] // Gut. – 2004. - Vol. 53 (7). – P. 978-992.
13. Fitzgerald K. A. Endotoxin recognition and signal transduction by the TLR4/MD2-complex / K. A. Fitzgerald, D. C. Rowe, D. T. Grolenbock // Microbes Infection. – 2004. – Vol. 6 (15). – P.1361-1367.
14. Identification of two major sites in the type I interleukin-1 receptorcytoplasmic region responsible for coupling to pro-inflammatory signaling pathways / J. Slack, K. Schooley, T. Bonnert [et al.] // J. Biol. Chem. – 2000. – Vol. 275. – P. 4670-4678.
15. Lack of genetic association of the Toll-like receptor 4 (*TLR4*) Asp299Gly and Thr399Ile polymorphisms with spondylarthropathies in a Hungarian population / P. Gergely, Jr. A. Blazsek, Z. Weiszhá [et al.] // Rheumatology. – 2006. – Vol. 45 (10). – P. 1194-1196.
16. Phylogenetic variation and polymorphism at the toll-like receptor 4 locus (TLR4) / I. Smirnova, A. Poltorak, E. Chan [et al.] // Genome Biol. – 2000. – Vol. 1. – P. 2-9.
17. The tlr4 (tlr4 Asp299Gly) polymorphism is a risk factor for gram-negative and haematogenous osteomyelitis / A. H. Montes, V. Asensi, V. Alvarez [et al.] // J. Clin. Exp. Immunol. – 2006. – Vol. 143 (3). – P. 404-413.

Summary

THE ROLE OF POLYMORPHISM OF TOLL-LIKE RECEPTOR 4 ASP299GLY IN DEVELOPMENT OF A BACTERIAL INFECTIONS, SEXUALLY TRANSMITTED DISEASES

Izmaylova O. V., Shlykova O. A., Bobrova N. A., Kaidashev I.P.

Key words: congenital immunity, polymorphism, Toll-like receptor, bacterial infections, sexually transmitted diseases

The purpose of this study was to analyze the association between gene of Toll-like receptor 4 Asp299Gly polymorphism and bacterial infections, sexually transmitted diseases, as well as study the prevalence of this polymorphism among healthy people of the Poltava population. The group of healthy patients included 299 men and women living in the Poltava region, and 156 patients diagnosed of urogenital infection. It established the high frequency of allele G and the AG and GG genotypes among patients with bacterial infections, sexually transmitted infections, compared with practically healthy people of the Poltava population. These results confirm the important role of Toll-like receptors in the realization of the innate immune response and allow for consideration of gene Toll-like receptor 4 Asp299Gly polymorphism as an additional prognostic indicator in genetic research.

Ukrainian Ministry of Health Public Service,
Ukrainian Medical Stomatological Academy

Матеріал надійшов до редакції 16.12.09

УДК 616-056-002-092.9:615

ВПЛИВ ФУЛЕРЕНІВ НА РОЗВИТОК АЛЕРГІЧНОГО ЗАПАЛЕННЯ В ЕКСПЕРИМЕНТІ

Куценко Н.Л., Микитюк М.В., Боброва Н.О., Кайдашев І.П.

Науково-дослідний інститут генетичних та імунологічних основ розвитку патології та фармакогенетики Вищого державного навчального закладу України «Українська медична стоматологічна академія», м. Полтава

Исследовано влияние фуллерена C_{60} (FC_{60}) и модифицированого фуллерена (1,2 метанофуллерен C_{60})-61 карбоксилацида на развитие аллергического воспаления на модели бронхиальной астмы. Экспериментальная модель бронхиальной астмы была воспроизведена на мышах линии Balb/c, путем внутрибрюшинной сенсибилизации с последующей ингаляцией 1% раствором овальбумина. Животным с бронхиальной астмой внутрибрюшинно вводили водную дисперсию FC_{60}, водную дисперсию FC_{60} в смеси с овальбумином, водный раствор модифицированного фуллерена и коньюгированного с овальбумином. Исследования показали, что введение животным разных форм фуллеренов C_{60} приводило к снижению интенсивности аллергического воспаления. Наблюдался терапевтический эффект как для фуллерена, коньюгированного с овальбумином, так и не коньюгированного.

Ключевые слова: фуллерены, бронхиальная астма, овальбумин, аллергическое воспаление.

Проблема лікування атопії залишається найбільш актуальною в сучасній медицині. Нові напрямки в розробці ефективних фармакологічних препаратів, без сумніву, допомагають вирішенню цієї проблеми, але в основній мірі дія лікарських засобів має симптоматичний характер. Відсутність стійкого ефекту після відміни прийому препарату і визначає їх дію недостатньою, що потребує пошуку нових високоефективних засобів, здатних впливати на патогенетично-імунологічну ланку розвитку алергічних захворювань.

Фулерени – унікальні моноатомні молекули, що мають форму сферичного каркасу, що вміщує 60 та більше атомів вуглецю. Відкриття фулеренів викликало стрімкий потік публікацій в науковому світі. Гідрофобна сфера, велика поверхня, висока спорідненість до електронів – основні приваблюючі особливості для використання цих речовин в медицині: в якості ефективних антиоксидантів, засобів цілеспрямованої доставки ліків та вакцин, надання нових властивостей відомим препаратам за рахунок їх модифікації [1,2,4].

Протягом останніх 17 років науковцями були синтезовані чисельні похідні фулеренів C_{60} (FC_{60}), в тому числі і водорозчинні, розроблені різноманітні способи отримання наносуспензій чистого фулерену та застосування їх в різних областях медицини [13]. Нещодавно було відмічено, що окремі наночастинки здатні пригнічувати розвиток алергічного запалення. Виявлено, що сенсибілізовані тучні клітини та базофіли периферійної крові, в цитоплазму яких попередньо вводили модифікований розчинний в воді фуллерен, виділяють значно менше гістаміну та цитокінів алергічної реакції після контакту з алергеном, порівнюючи з несенсибілізованими клітинами. Ін'єкція фулеренів мишам попереджала розвиток реакції гіперчутливості негайного типу, не викликаючи побічних реакцій. За допомогою імуногістохімічного контрастування клітин виявлено, що більша частина фулеренів зосереджена в цитоплазмі. Це призвело до появи припущень, що процес пригнічення запальних реакцій відбувається на рівні внутрішньоклітинних механізмів. Таким чином, на відміну від багатьох існуючих протиалергійних препаратів фулерени здатні дезактивувати тучні клітини та базофіли навіть до моменту вивільнення медіаторів запалення [15]. Отримані дані свідчать про нову біологічну дію фулеренів та надають новий шлях до розробки протизапальної терапії при астмі, ревматоїдному артриті, захворюваннях серцево-судинної системи та ін.

Механізм дії фулеренів до кінця не вивчено і не обґрунтована ефективність їх використання в клінічній медицині. Крім того, відсутні дані впливу фулерену C_{60} на розвиток алергічного запалення при бронхіальній астмі. Тому, метою нашого дослідження було вивчення впливу різних форм фулерену C_{60} при експериментальній бронхіальній астмі.

Матеріали та методи

Дослідження проводилося на 36 мишах лінії Balb/c віком 6 тижнів. Всі тварини були поділені на 6 груп, по 6 тварин в кожній. Перша група – інтактні тварини. Другій контрольній групі тварин та останнім групам викликали експериментальну бронхіальну астму (БА) шляхом внутрішньочеревної сенсибілізації тварин розчином овальбуміну (ОВА група) в стерильному фізіологічному розчині. Сенсибілізацію проводили в 0 та 14 день. На 24, 25, 26 тваринам вводився ОВА у вигляді аерозолю, генерованого із 1% ОВА у 0,9% фізіологічному розчині за допомогою інгалятора ультразвукового «Муссон-2» (ФГУП «Алмаз», г. Ростов-на-Дону, Россия) протягом 40 хвилин. За годину до кожної інгаляції тваринам вводили внутрішньочеревно досліджувані фулерени у вигляді розчинів. Третій групі вводили FC_{60} (ОВА-FC_{60} група), четвертій – FC_{60} в суміші з ОВА (ОВА-FC_{60}-ОВА група), п'ятій - розчин модифікованого фулерену (1,2метанофулеренC_{60})-61карбоксилацид (ОВА-mFC_{60} група), шостій - розчин модифікованого фулерену кон'югованого з ОВА (ОВА-mFC_{60}-ОВА група) [5]. Контрольній групі тварин вводили фізіологічний розчин. На 26 день, до та після останньої інгаляції ОВА, усім тваринам тричі протягом 30 хвилин була проведена ректальна термометрія (схема 1). Евтаназію тварин проводили методом цервікальної дислокації. Всі маніпуляції з тваринами проводили з дозволу комісії по біоетиці Вищого державного навчального закладу України «УМСА».

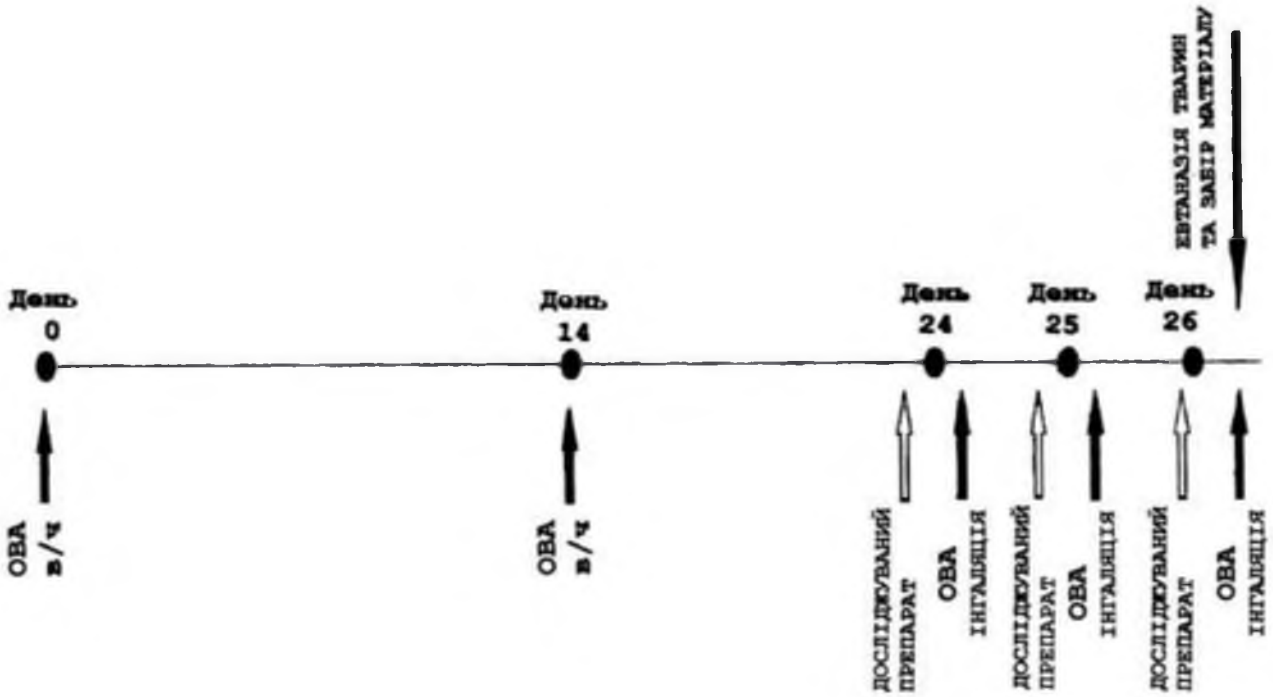

Схема 1. Загальна схема дослідження дії фулеренів C_{60} при експериментальній бронхіальній астмі

Водну дисперсію фулеренових часточок FC_{60} з розміром 10-200 нм, поверхні яких складалися з модифікованих гідроксильованих фулеренів отримували шляхом перемішування Фулерену C_{60} (Sigma, USA) з деіонізованою водою на магнітній мішалці протягом 2-х місяців [8]. До водної дисперсії FC_{60} додавали розчин ОВА (Sigma, USA) з кінцевою концентрацією 10,4 г/л.

Для приготування розчину модифікованого фулерену mFC_{60} реагент (1,2метанофулеренС$_{60}$)-61карбоксилацид (Sigma, USA) 1,5 мг розчиняли в 0,25 мл піридину, до нього додавали 8 мг N-гідроксисукциніміду (Sigma, USA). Діциклогексилкарбодіімід (Fluka) розчиняли у 0,15 мл піридину і додавали до розчини фулеренів. Суміш залишали при кімнатній температурі на 48 годин. Потім повільно додавали до 1 мл розчину ОВА (Sigma, USA) з концентрацією білку 10,4 мг/мл при pH 9,5. Рівень pH регулювали 1М $NaHCO_3$. Суміш залишали на 4 години при кімнатній температурі і діалізували проти ФСБ при температурі 4^{0}С протягом ночі [6].

Вивільнення гістаміну під час розвитку реакції гіперчутливості негайного типу (РГНТ) визначали за рівнем зниження температури у тварин, яку вимірювали у тварин ректально, за допомогою електронного термометра Microlife MT 1951 (Microlife AG, Швейцария). Термометрію проводили один раз до та тричі протягом 30 хвилин після останньої інгаляції ОВА.

Для оцінки змін в органах мішенях під час розвитку РГНТ підраховували число еозинофілів та базофілів у тканинах легень, застосовуючи метод тканинних відбитків. Отримані препарати підсушували при кімнатній температурі 5-10 хв. Відбитки фарбували фарбою-фіксатором Май-Грюнвальда та Романовського-Гімзи. В отриманих препаратах підраховували число еозинофільних та базофільних клітин [3].

Для оцінки впливу FC_{60} та mFC_{60} на стан імунокомпетентних клітин Т- хелперів та Т-супресорів у тварин з експериментальною БА визначали експресію $CD4^+$ та $CD8^+$ молекул в суспензії спленоцитів, використовуючи метод проточної цитометрії. Спленоцити отримували в асептичних умовах за загально відомим методом [3]. При цьому суспензію інкубували в присутності моноклональних антитіл до антигенів CD4 та CD8, мічені флюорисцеінізотіоционатом (Caltag, США). Флюорисценцію клітин визначали на проточному цитофлюориметрі EPIX LX-MCL (Beckman Coulter, США), використовуючи програму System II^{TM} software.

Отриманий цифровий матеріал був статистично оброблений: проводили обчислення середнього арифметичного в групах (M), середнього квадратичного відхилення (m), вірогідність отриманих результатів визначали за t-критерієм Вілкоксона та t-коефіцієнтом Ст'юдента на персональному комп'ютері за допомогою стандартного пакета програми STATISTICA 6.0

Результати та їх обговорення

Дослідження були присвячені вивченню впливу наночастинок – фулеренів на розвиток алергічного запалення з метою пошуку та розробки нових патогенетичних протиалергічних препаратів. Тому, на першому етапі ми викликали бронхіальну астму у експериментальних тварин, шляхом сенсибілізації мишей розчином овальбуміну. У сенсибілізованих ОВА мишей спостерігали зміну в їх поведінці. Після інгаляції ОВА експериментальні тварини чхали, терли лапками мордочки, поводили себе неспокійно. Окрім чітко виражених клінічних проявів РГНТ, нами було досліджено основну патофізіологічну реакцію – вивільнення гістаміну з сенсибілізованих базофілів та тучних клітин під час взаємодії алергену з специфічними IgE на поверхні цих клітин. Як відомо, гістамін, приймає участь в терморегуляції організму. Медіатор знижує внутрішню температуру та регулює потовиділення, що також знижує температуру тіла [9]. Тому, зниження температури тіла прямо відображає вивільнення ос-

новного медіатору реакції гіперчутливості негайного типу гістаміну. Таким чином, у сенсибілізованих ОВА тварин після інгаляції ОВА нами виявлено вірогідне зменшення температури тіла на 3ºС в порівнянні з інтактними тваринами вже через 10 хвилин після інгаляції (рис.1), після чого відмічено її поступове повільне відновлення. Але навіть через 30 хвилин вона залишалась низькою – на 2ºС, порівнюючи з інтактом. Отже, вірогідне зниження температури тіла у сенсибілізованих тварин після інгаляції причинного алергену свідчить про патологічне надмірне вивільнення гістаміну з депо.

Інгаляція ОВА у тварин викликала також зміни в органах мішенях. В мазках-відбитках легень нами було відмічено вірогідне підвищення числа еозинофілів у 4 рази порівняно із інтактною групою (табл.1) та тенденція до збільшення базофілів (в 1,5 рази вище ніж у інтактних тварин). Відомо, що легенева еозинофілії є типовою характеристикою алергічного запалення дихальних шляхів при експериментальній БА у мишей [19].

Таблиця 1

Вплив фулеренів на рівень еозинофілів та базофілів в відбитках тканин легень у тварин з експериментальною БА (M±m) (n=6)

Групи тварин	Кількість еозинофілів, %	Кількість базофілів, %
Ін такт	4,3±1,0#	1,6±0,5
ОВА-ОВА	16,5±4,9	2,5±0,8
ОВА- FC_{60}	14,3±4,8	2,5±1,04
ОВА- FC_{60}-ОВА	12,5±4,7	2,3±1,5
ОВА- mFC_{60}	5,5±1,5#	3,0±0,8
ОВА- mFC_{60}-ОВА	12,2±4,1	3,5±1,5

*Примітки: * - вірогідно щодо показників інтактної групи*
 # - вірогідно щодо показників групи тварин з експериментальною БА (ОВА-ОВА).

Одночасно з дослідженням змін в органах мішенях, нами було виявлено зміну кількості основних субпопуляцій лімфоцитів в суспензії спленоцитів у тварин сенсибілізованих ОВА в порівнянні з інтактною групою. При цьому, кількість $CD4^+$ зменшилась на 20%, а $CD8^+$ - на 27% (рис. 2, 3). Таким чином, сенсибілізація мишей ОВА з послідуючою інгаляцією тваринам причинного алергену призводила до клінічних симптомів алергічного запалення, викиду основного медіатору алергії – гістаміну, легеневої еозинофілії та зниження загальної кількості імунокомпетентних клітин в суспензії спленоцитів свідчить про розвиток у тварин бронхіальної астми, як модель розвитку алергічного запалення для подальшого вивчення впливу фулеренів.

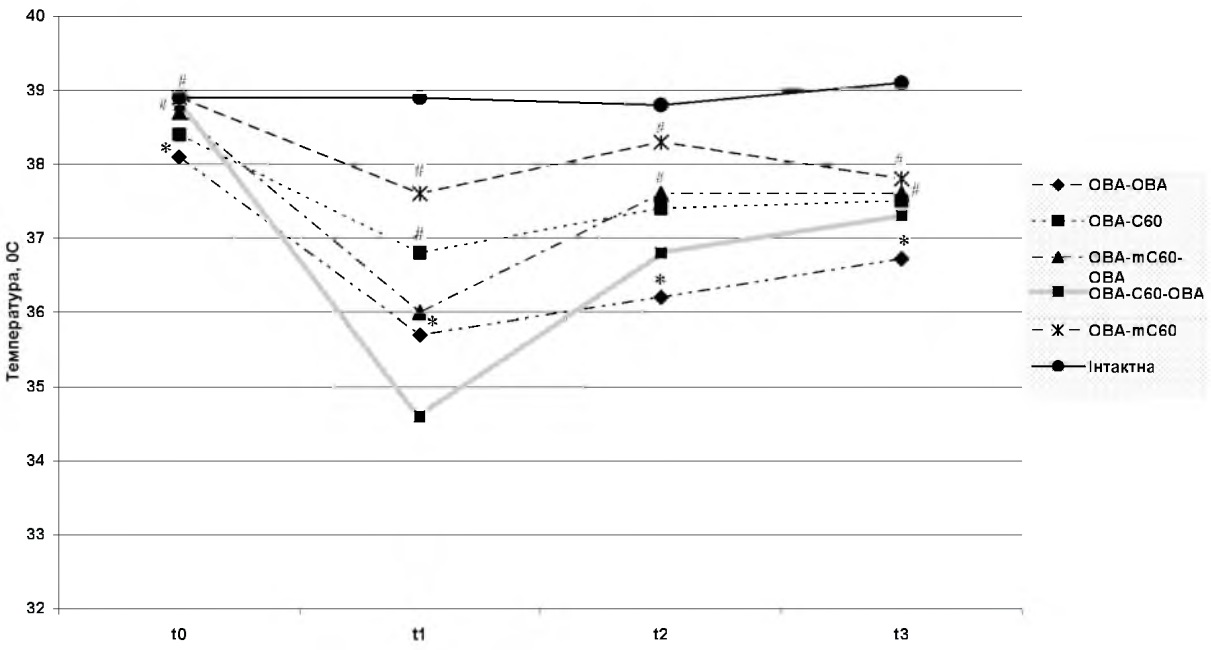

Рис.2 Вплив фулеренів на рівень $CD4^+$ в суспензії спленоцитів у тварин з експериментальною БА.

Примітки: наведені індивідуальні значення, горизонтальна риска відображає середній показник у групі.
** - вірогідно щодо показників інтактної групи*
 # - вірогідно щодо показників групи тварин з експериментальною БА (ОВА-ОВА).

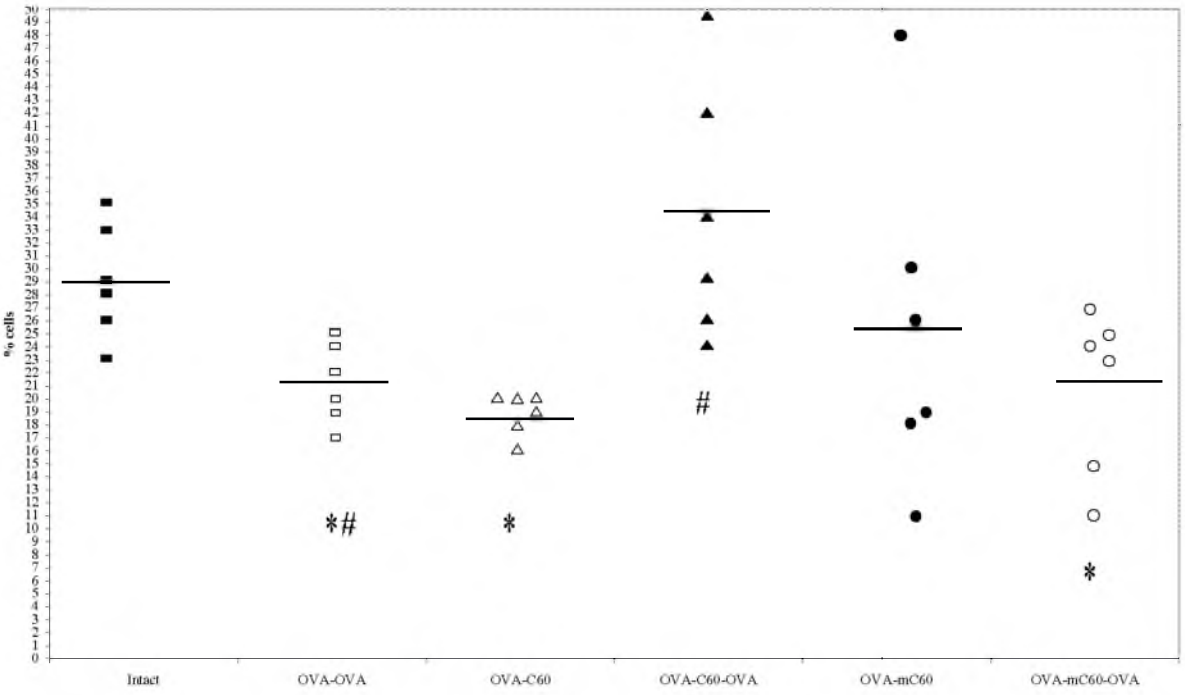

Рис.3 Вплив фулеренів на рівень $CD8^+$ в суспензії спленоцитів у тварин з експериментальною БА

Примітки: наведені індивідуальні значення, горизонтальна риска відображає середній показник у групі.
** - вірогідно щодо показників інтактної групи*
 # - вірогідно щодо показників групи тварин з експериментальною БА (ОВА-ОВА).

Під час вивчення впливу водної дисперсії FC_{60} на розвиток алергічного запалення нами було досліджено температуру тіла експериментальних тварин з метою оцінки вивільнення гістаміну. Ректальна температура у сенсибілізованих тварин до інгаляції ОВА була найнижчою в групі тварин з експериментальною БА – на 1ºС нижче ніж у інтактних тварин. В групах тварин, яким попередньо вводили фулерени, коливалась між показниками інтактних та тварин з БА.

Через 10 хвилин після останньої інгаляції овальбуміном в групі тварин з експериментальною БА спостерігалось різке падіння ректальної температури. Крім того вірогідне падіння ректальної температури відмічено в усіх інших дослідних групах в порівнянні з інтактними тваринами. При цьому мінімальне зниження температури нами було відмічено у тварин, яким вводили FC60 та mFC60.Саме ці форми фулеренів вірогідно попереджали зниження температури у тварин з БА. А саме, у цих тварин температура не опускалася нижче 36,8ºС, в той час, як у тварин з БА знижувалась до 35,6ºС.

Через 20 хвилин після останньої інгаляції овальбуміном в усіх експериментальних групах тварин спостерігалася тенденція до нормалізації ректальної температури. При цьому температура у тварин, яким вводили FC60 та mFC60 становила на 1,5-2ºС вищою, ніж у тварин з БА.

На 30-й хвилині вимірювання показники ректальної температури продовжували наближатися до таких показників інтактної групи. На цьому етапі вірогідно вищою була температура у тварин, яким також вводили mFC60 та mFC60-OVA, в порівнянні з показниками тварин БА.

Таким чином, попереднє введення фулеренів експериментальним тваринам з БА призводило до попередження зниження температури тварин. Під час введення фулеренів найбільш ефективним виявився mFC_{60}, що свідчить про здатність цих наночастинок пригнічувати розвиток реакції гіперчутливості негайного типу.

У тварин, яким вводили водну дисперсію FC_{60}, спостерігалося зниження числа еозинофілів на 13% у порівнянні з групою тварин з БА (табл.1). До найбільш суттєвого зниження кількості еозинофілів, на 66,7 %, призводило введення mFC_{60}. Введення складних форм фулеренів – FC_{60} в суміші із ОВА та mFC_{60}, кон'югованого із ОВА, призводило до незначного зниження числа еозинофілів, у цих тварин ми продовжували спостерігати легеневу еозинофілію. Отже найнижчі показники кількості еозинофілів відмічались у тварин, яким вводили mFC_{60}, і саме у тварин даної групи число еозинофілів наближалося до показників інтактної групи і складало 5,5±2%. Тож зниження рівня легеневої еозинофілії є показником того, що введення фулеренів виявляло імунорегулюючу дію при імунологічному запаленні в легенях при експериментальній БА. Найбільш ефективним виявився модифікований некон'югований FC_{60}. Під час вивчення впливу фулеренів на кількість базофілів в тканинах легень нами не виявлено суттєвих змін числа цих клітин між тваринами з БА та тваринами, яким вводили фулерени.

При оцінці імунної системи мишей з БА в групі тварин, яким вводили модифікований фулерен, кон'югований з ОВА, спостерігалося підвищення експресії молекул $CD4^+$ спленоцитів на 25%, а в групі тварин, яким вводили FC_{60} в суміші з ОВА на 6%

(мал. 2). В той час як в групах тварин, яким вводили інші форми фулеренів, рівень експресії молекул $CD4^+$ майже не змінювався. Кількість $CD8^+$ клітин вірогідно збільшувалась на 63% у тварин, яким вводили FC_{60} в суміші з ОВА та у тварин, яким вводили модифікований фулерен на 16,3% (мал. 2). В групі тварин, яким вводили водну дисперсію FC_{60} відмічалося зниження $CD8^+$ клітин на 14,3% у порівнянні із тваринами з БА. Введення модифікованого FC_{60}, кон'югованого з ОВА, не виявило змін у рівні експресії $CD8^+$.

З літературних джерел відомо про спробу використання хімічних властивостей фулеренів для лікування алергій [17]. Науковці звернули увагу на можливість фулеренів взаємодіяти з вільними радикалами – хімічні молекули, які мають неспарені електрони [7,14,16,18]. Так, фулерен C_{60} легко приєднує вільні радикали, таким чином нейтралізуючи їх. Результати досліджень свідчать, що такі властивості фулеренів можуть бути використані для захисту нервових клітин від руйнівного впливу вільних радикалів. Завдяки значним зусиллям та взаємодії науковців-медиків та науковців, що займаються дослідженнями в сфері нанотехнологій, був створений фулерен, в структуру, якого включено додаткові функціональні групи. Модифікація фулерену підвищила розчинність цих наночастинок. За даними дослідників, після цих змін фулерени повністю втратили токсичні властивості для тканин організму. Наступним етапом вчені намагались внести ці модифіковані фулерени мишам в середину тучних клітин. При цьому під час провокаційних тестів за допомогою причинних алергенів на фоні фулеренів сила алергічної реакції зменшувалась. Знижувався викид гістаміну, а також активність інших біологічно-активних речовин при алергічному запаленні. За даними вчених це відбувалось завдяки зв'язуванню розчинними фулеренами вільних радикалів, що з'являються при алергії [15] .

Слід відмітити, що самі по собі фулерени є токсичними речовинами, наприклад, фулерен C_{60} призводить до окислення ліпідів. В одній з робіт відмічено, що при хімічній модифікації фулеренів гідроксильними або карбоксильними групами наночастинки стають менш токсичними. Це відбувається завдяки підвищенню гідрофільності фулеренів, в результаті чого фулерен стає водорозчинним. Доведено, що розчинність фулеренів в воді прямопропорційна зменшенню їх токсичності. Наприклад, у $C_{60}(OH)_{24}$ не виявлені токсичні властивості, навіть при максимально допустимих концентраціях [11].

Повідомлялось про винахід протипухлинних ліків на основі фулеренів. Показано, що нітроксидні метанофулерени в комбінації з циклофосфамідом має протипухлинну дію при лейкемії [10].

На сьогоднішній день активно створюються та вивчаються сполуки, в структурі яких фулерен ковалентно або за допомогою міжмолекулярних зв'язків з'єднаний з іншими активними речовинами [12].

На теперішній час продовжується вивчення фізико-хімічних властивостей фулеренів та можливість розширення їх застосування в клінічній медицині.

Таким чином, у проведеному нами дослідженні було вивчено вплив фулерену C_{60} та розчиненого модифікованого фулерену C_{60} на розвиток алергічного запалення. При цьому нами відтворено модель бронхіальної астми у мишей шляхом сенсибілізації ОВА та його інгаляцією, що підтверджено розвитком РГНТ (зміна поведінки, викид гістаміну, зниження температури тіла, легенева еозинофілія та зміна рівню імунокомпетентних клітин) у тварин.

За умов розвитку експериментальної бронхіальної астми введення різних форм фулеренів C_{60} призводило до зниження інтенсивності алергічного запалення. Причому терапевтичний ефект спостерігався як для фулерену, кон'югованого з алергеном, так і не кон'югованого. Отже, спостерігався прямий антиалергійний ефект фулерену.

Література

1. Залесский В. Н., Дынник О. Б. Молекулярная медицина: применение нанотехнологий для молекулярной визуализации в кардиологии / В. Н. Залесский, О. Б. Дынник // Укр. мед. часопис. – 2008. – №1. – С. 25–32.
2. Использование нанотехнологии в эндодонтическом лечении зубов / В. Румянцев, Ю. Цатурова, Ф. Черджиева [и др.] // CATHEDRA. – 2008. – №1. – С. 46–49.
3. Методи клінічних та експериментальних досліджень в медицині / Л. В. Беркало, О. В. Бобович, Н. О. Боброва [та ін.]; під ред. І. П. Кайдашева. – П. : Полімет, 2003. – 320 с.
4. Нанотехнології, наномедицина: перспективи наукових досліджень та впровадження їх результатів у медичну практику / Л. Г. Розенфельд, В. Ф. Москаленко, І. С. Чекман [та ін.] // Укр. мед. часопис. – 2008. – №5. – С. 63–68.
5. A causative relation ship exists between eosinophils and the development of allergic pulmonary pathologies in the mouse / H. H. Shen, S. I. Ochkur, M. P. McGerry [et al.] // J. Immunology. – 2003. – Vol. 170. – P. 3296–3305.
6. Antigenicity of fullerenes: Antibodies specific for fullerenes and their characteristics / B.-X. Chen, S.R. Wilson, M. Das [et al.] // Immunology. 1998. – Vol. 95. – P. 10809–10813.
7. Fullerene derivatives: an attractive tool for biological applications / S. Bosi, T. Da Ros, G. Spalluto [et al.] // Eur. J. Med. Chem. – 2003. – Vol. 38. – P. 913–923.
8. Fullerene is in vivo Powerful Antioxidant With no Acute or Sub-acute Toxicity / N. Gharbi, M. Pressac, M. Hadchouel [et al.] // Nano Letters. – 2005. – Vol. 5. – P.12–16.
9. Fullerene nanomaterials Inhibit the allergic response / J. J. Ryan, H. R. Bateman, A. Stover [et al.] // J. Immunol. – 2007. – Vol. 179. – P. 665–672.
10. Gubskaya V. P. Synthesis, structure and biological activity of nitroxide malonate methanofullerenes / V. P. Gubskaya, L. Sh. Berezhnaya, A. T. Gubaidullin [et al.] // Org.Biomol.Chem. – 2007. – Vol. 5. – P. 976–981.
11. Hopkin M. Flies get a grip / M. Hopkin // Nature. – 2004. – Vol. 431(7010). – P. 756–756.
12. Lynch M. The Origins of Genome Complexity / M. Lynch, J. S. Conery // Science. – 2003. – Vol. 302 (5649). – P. 1401–1404.
13. Moghimi S. M. Nanomedicine: current status and future prospects / S. M. Moghimi, A. C. Hunter, J. C. Murray // FASEB J. – 2005. – Vol. 19. – P. 311–330
14. Nakamura E. Functionalized fullerenes in water: the first 10 years of their chemistry, biology, and nanoscience / E. Nakamura, H. Isobe // Acc. Chem. Res. – Vol. 36. – P. 807–815.
15. Ryan J. J. Fullerene nanomaterials Inhlbit the allergic response / J. J. Ryan, H. R Bateman, A. Stover // J Immunol. – 2007. – Vol. 1 . – P. 665–672.
16. Satoh M. Pharmacological studies on fullerene (C_{60}), a novel carbon allotrope, and its derivatives / M. Satoh, I. Takayanagi // J. Pharmacol. Sci. – 2006. – Vol. 100. – P. 513–518.
17. Schwartz L. Effector cells of anaphylaxis: mast cells and basophiles / L. Schwartz // Novartis Found, Symp. – 2004. – Vol. 257. – P.65–74.
18. Taylor A. E. Fullerene derivatives protect against oxidative stress in murine macrophage line cells and ischemia-reperfused lungs / A. E. Taylor // Am. J. Physiol. – 2004. – Vol. 287. – R1–R2.
19. Treatment with anti-CC chemokine receptor 3 monoclonal antibody or dexamethasone inhibits the migration and differentiation of bone marrow $CD34^+$ progenitor cells in an allergic mouse model / S. Ben, X. Li, F. Xu [et al.] // Allergy. – 2008. – Vol. 63. – P. 1164–1176.

Summary

EFFECT OF FULLERENES ON THE ALLERGIC INFLAMMATION DEVELOPMENT IN EXPERIMENT

Kutsenko N.L., Mikityuk M.V., Bobrova, N.A., Kaidashev I.P.

Key words: fullerenes, bronchial asthma, ovalbumin, allergic inflammation.

The influence of fullerene C_{60} (FC_{60}) and modification of the fullerene (1,2 methanofulleren C_{60})-61 carboxilatsida on the development of allergic inflammation in a model of bronchial asthma was studied.

The experimental model of asthma has been replicated in mice of the Balb / c line, by intraperitoneal sensitization followed by inhalation of 1% solution of ovalbumin. The animals with bronchial asthma intraperitoneally introduction aqueous dispersion of FC60, aqueous dispersion of FC60 in a mixture with ovalbumin, an aqueous solution of the modified conjugated with ovalbumin.

Studies have shown that the different forms of fullerenes C60 led to intensity of allergic inflammation decrease. Therapeutic effect as for the fullerene conjugated with ovalbumin, as not conjugated was observed.

Ukrainian Ministry of Health Public Service,
Ukrainian Medical Stomatological Academy

Матеріал надійшов до редакції 111.11.2009

УДК [543.645.6:616.748-092.9]:543.42

ДОСЛІДЖЕННЯ ХРОМАТОГРАФІЧНОГО СПЕКТРУ ПЕПТИДНОГО КОМПЛЕКСУ, ОТРИМАНОГО ІЗ СТЕГНОВИХ М'ЯЗІВ ЩУРІВ

Весніна Л.Е., Солохіна І.Л.

Науково-дослідний інститут генетичних та імунологічних основ розвитку патології та фармакогенетики,
Вищий державний навчальний заклад України
«Українська медична стоматологічна академія», м. Полтава.

В работе представлены данные о получении комплекса пептидных веществ из бедренных мышц крыс и определении их характеристик с помощью обратно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии. Исследование хроматографического спектра комплекса пептидов бедренных мышц в сравнении с пептидным комплексом коркового вещества почек крыс позволило определить различия как в количестве фракций, их расположении вдоль хроматограммы, так и по их гидрофобности.

Ключевые слова: регуляторные пептиды, пептидный комплекс бедренных мышц, высокоэффективная жидкостная хроматография.

Одним із найважливіших та актуальних питань сучасної біології та медицини полягає в дослідженні ролі регуляторних пептидів в механізмах регуляції гомеостазу в нормі та при патології. Останні дослідження свідчать, що головні системи, відповідальні за підтримку сталості внутрішнього середовища - нервова, ендокринна, імунна мають єдиний механізм хімічної регуляції, який реалізується опосередковано синтезом та секрецією клітинних медіаторів: пептидних гормонів та цитокінів [12].

Пептидні молекули виконують сигнальну роль та роль регуляторів різноманітних функцій організму – від окремих функцій спеціалізованих клітин до складних поведінкових актів [7].

В основі пептидергічної регуляції знаходиться загальний тип отримання та переносу інформації на субклітинному, клітинному та тканинному рівнях, що забезпечується поступовим переходом спектрів біологічної активності окремих пептидів та спроможністю адекватно реагувати на різноманітні втручання [12].

На даний момент досягнутий значний прогрес в області створення лікарських препаратів на основі пептидів, активно вивчається їх клінічна ефективність з метою обґрунтування використання в комплексній терапії різноманітних захворювань та патологічних станів [11].

Так, зокрема, під керівництвом професора Кайдашева І.П. на базі Центральної науково-дослідної лабораторії Української медичної стоматологічної академії проводились дослідження біологічної активності низькомолекулярних пептидних комплексів нирок, печінки, селезінки, тимусу, міокарда, пародонта, лімфовузлів, підшлункової залози. Вивчалась терапевтична активність окремих пептидів при експериментальних патологічних станах (аутоімунний панкреатит, алоксановий діабет, гострий стрес, гостре отруєння, тощо), їх імунотропна дія. Проводилась розробка фармакологічної речовини на основі пептидних комплексів [4,5,6].

Подальші дослідження в цій актуальній області, зокрема, виділення нових пептидних речовин, визначення їх біологічної активності, дали б змогу доповнити уяву про міжклітинну пептидергічну взаємодію в цілісному організмі, сприяти розвитку фармакологічного аспекту даного питання, розширюючи спектр використання пептидних речовин в якості лікарських засобів. Тому метою роботи стало отримання пептидного комплексу стегнових м'язів щурів та визначення його хроматографічного спектру.

Матеріали та методи дослідження

Для дослідження використовували скелетні м'язи 6-ти місячних щурів лінії Вістар, в якості контролю