

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 C₆₀ (FC₆₀) and modification of the fullerene (1,2 methanofulleren C₆₀)-61 carboxylatsida 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 11.11.2009

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

використовували пептидний комплекс кіркової речовини нирок. Поліпептидні речовини екстрагували з тканин за методикою [1] в нашій модифікації.

Тканини скелетних м'язів очищували від судин, фасцій та жирової тканини, подрібнювали до консистенції фаршу у ступці на холодну, заливали холодним ацетоном у співвідношенні 1:10 та зберігали при +4 °С протягом 12-24 годин. Потім ацетон видаляли, тканини висушували при постійному помішуванні при кімнатній температурі. Висушені тканини екстрагували 3% льодовою оцтовою кислотою з додаванням 0,1% хлориду цинку та 0,1% хлориду магнію у співвідношенні 1:10 при +4 °С протягом 72 годин при постійному перемішуванні.

Суміш фільтрували для видалення дисперсного осаду, фільтрат обробляли ацетоном у співвідношенні 1:10 при +4 °С протягом 12-24 годин. Отриманий преципітат промивали сумішшю ацетону та ефіру у співвідношенні 1:1, висушували та розчиняли у підкисленій дистильованій воді. Для отримання пептидів з молекулярною масою до 10 кДа розчин центрифугували через фільтр з діаметром пор 10 кДа.

Поліпептидні екстракти аналізували в умовах обернено-фазової високоефективної рідинної хроматографії, яка дає можливість розділення складних сумішей та дослідження речовин тваринного походження, що мають мінімальні відмінності у фізико-хімічних властивостях. Дослідження проводили у двох паралелях. Для ідентифікації отриманого пептидного комплексу 0,1 г досліджуваного матеріалу розчиняли у 1,0 мл дистильованої води, центрифугували протягом 15 хвилин при 3000 об/хв. Отриманий розчин фільтрували через мембранний капроновий фільтр ММК-0,20 з розміром пор 0,2 мкм, першу порцію фільтрату відкидали. Для аналізу використовували проби об'ємом 6 мкл.

На рідинному хроматографі «Міліхром-4ВУФ» (Росія) використовували систему SMART tm SYSTEM (LKB, «Pharmacia», Швеція). Дотримувалися наступних умов: колонка μ RCP-C2/C18-SC 2,1/10, діаметр 10 мм, довжина 600 мм (Code No. 17-0704-0, «Pharmacia» (Швеція); сорбент – Сефадекс G-25; рухома фаза: ацетонітрил - 1% розчин трифтороцтової кислоти («Applied Biosystems», USA Analytical Grade) – вода дегазована через фільтр ПОР-16 або іншим зручним способом.

Градентне елювання відбувалось за наступних умов:

№ ПФ	Об'ємне співвідношення компонентів ПФ, об %			Об'єм ПФ, мкл
	Ацетонітрил	1% ТФО кислота	Вода	
1	0	1	9	400
2	0,5	1	8,5	50
3	1	1	8	50
4	2	1	7	100
5	4	1	5	400
6	8	1	1	400
7	8	1	1	50
8	10	1	0	500

Швидкість рухомої фази – 80 мкл/хв, детекцію проводили при довжині хвилі 280 нм та температурі колонки 20°C.

Результати та їх обговорення

Вперше пептидні біорегулятори багатоклітинних систем було отримано з гіпоталамічної області мозку, епіфізу, тимусу та судинної стінки за допомогою оцтовокислої екстракції в присутності іонів Zn^{2+} , з наступним осаджуванням комплексів поліпептидів ацетоном та очищуванням методом гель-фільтрації для видалення важкорозчинних фракцій [8,9,10]. Даний метод екстракції пептидів із біологічних тканин дозволив позбавитись баластних та алергенних компонентів [2].

Нами були внесені модифікації в методику виділення пептидних екстрактів, що базувались на використанні більш активної галогенвмісної органічної кислоти та введення в систему екстракції крім іонів цинку, іонів магнію [1]. Це дозволило отримувати пептидні комплекси з більш значною біологічною активністю [3].

Хроматографічний спектр екстракта стегнових м'язів щурів представлений на рис.1.

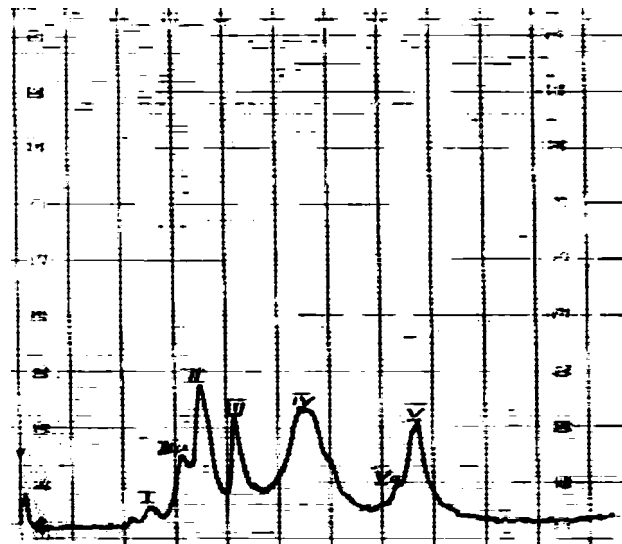


Рис 1. Хроматограма комплексу поліпептидів стегнових м'язів щурів

Тут та на рис. 2:

по осі ординат – оптична густина, опт. Од.;
по осі абсцис – час утримання, хв.

Аналіз хроматографічного спектру пептидів м'язів стегна показав наявність 5 фракцій. Фракції II та V включали додаткові піки (II, IIa та V, Va). Найбільш питома вага припадала на фракції II, III, IV та V. За обсягом фракції розподілилися наступним чином: IV, II, V, III, I. Враховуючи відносну рівномірність розподілення фракцій по довжині хроматограми, зроблено висновок про вміст пептидів з різним ступенем гідрофільності та гідрофобності у складі екстракту. Визначено, що основна маса речовини містилася в більш гідрофобній частині хроматограми з часом утримання від 20 до 50 хвилин та достатньо високій оптичній густині при 280 нм.

Для порівняння було використано пептидний екстракт, отриманий за таким же методом з кіркової речовини нирок щурів. Хроматограма пептидного комплексу кіркової речовини нирок представлена на рис.2.

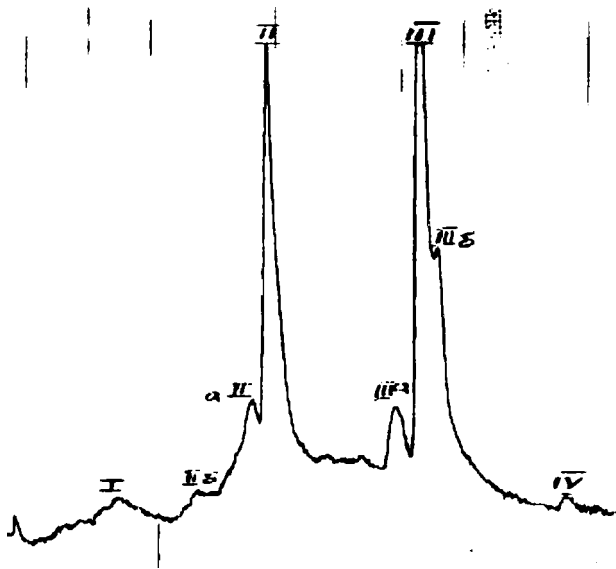


Рис 2. Хроматограма комплексу поліпептидів кіркової речовини нирок щурів.

Згідно результатам, комплекс регуляторних пептидів кіркової речовини нирок містить 4 фракції та відрізняється за характером їх розташування по довжині хроматограми. Також, фракції II та III мали по два додаткових піки (IIa, IIb та IIIa, IIIb, III). Основні фракції з найбільшою питомою вагою - II, III, розташувалися у частині хроматограми з меншим часом утримання до 50 хвилин та характеризувалися більшою гідрофільністю. Характерним було також наявність на хроматограмі піку з часом утримання близько 50 хвилин та достатньо високою оптичною щільністю при 280 нм. У цілому фракції розподілилися (в порядку збільшення питомої ваги) в послідовності I, IIb, II, IIa, IIIa, III, IIIb, IV.

Таким чином, нами було отримано поліпептидні екстракти стежкових м'язів та кіркової речовини нирок щурів. При дослідженні хроматографічного спектру отриманих речовин визначено відмінності як за кількістю фракцій, їх розташуванням впродовж хроматограми, так і за їх гідрофобністю.

Висока ефективність пептидних препаратів, яка неодноразово підтверджена в експериментальних дослідженнях та дослідом клінічного використання,

потребує подальше вивчення їх механізмів фізіологічної дії, розподілу в організмі, очікувані та побічні ефекти. А це, в свою чергу, окрім рішення важливіших проблем біологічної регуляції організму за фізіологічних умов, дозволить намітити нові підходи до терапії та профілактики багатьох захворювань.

Література

1. А.с. 10180А Україна. МКІ 5 А61 К37/00. Спосіб одержання біологічно-активної речовини, що має регенераторну та модулюючу дію // Промислова власність. - 1996. - №3. - С. 3.1.76-3.1.77.
2. Изучение белковых компонентов пептидных регуляторов природного происхождения / Г.А. Рыжак, П.А. Некрасов, О.И. Киселев, В.Х. Хавинсон // Бюл. эксперим. биологии и медицины. - 2003. - Т. 135, № 1. - С. 62-65.
3. Кайдашев И.П. Влияние почечных полипептидов на активность лимфоцитов при экспериментальном нефрите // Физиол. журн. - 1993. - Т. 39, № 5-6. - С. 52-56.
4. Кайдашев И.П. Новая группа биологических регуляторов багатоклітинних систем - пептиди головного комплексу гістосумісності // Журн. АМН України. - 2000. - Т. 6, №1. - С. 26-38.
5. Кайдашев И.П., Весніна Л.Е., Куценко Н.Л., Звягольська І.Н. Відтворення імунної відповіді на Апо- та гетероантигени введенням екзогенних пептидних комплексів здорових тканин при вторинних імунodefіцитах, викликаних дією антицитохромоксидазної сироватки // Проблеми екології та медицини. - 2004. - №1-2. - Т. 5. - С. 33-37.
6. Кайдашев И.П., Куценко Л.О., Боброва Н.О., та ін. Вивчення впливу пептидного екстракту підшлункової залози // Ліки. - 2005. - № 1-2. - С. 46-52.
7. Климов П.К., Барашкова Г.М. Эндогенные пептиды как единая система регуляторных веществ // Физиол. журн. им. И.М.Сеченова. - 1993. - Т.79, № 3. - С. 80-87.
8. Морозов В.Г., Хавинсон В.Х. Влияние экстракта из тимуса на процессы заживления ожоговых ран в эксперименте // Эксперим. хирургия и анестезиология. - 1974. - № 2. - С. 49-51.
9. Морозов В.Г., Хавинсон В.Х. Выделение, очистка и идентификация иммуномодулирующего полипептида, содержащегося в тимусе телят и человека // Докл. АН СССР. - 1981. - Т. 261, № 1. - С. 235-239.
10. Морозов В.Г., Хавинсон В.Х., Писарев О.А. Выделение из тимуса и изучение природы фактора, стимулирующего иммуногенез // Докл. АН СССР. - 1977. - Т. 233, № 3. - С. 491-494.
11. Хавинсон В.Х., Анисимов В.Н. Физиологические аспекты пептидной регуляции старения // - 2009. - Т. 13, № 4. - С. 254-258.
12. Хавинсон В.Х., Кветной И.М., Ашмарин И.П. Пептидергическая регуляция гомеостаза // Успехи соврем. биологии. - 2002. - Т. 122, № 2. - С. 190-203.

Summaru

THE INVESTIGATION OF CHROMATOGRAPHIC SPECTRUM OF PEPTIDE COMPLEX OBTAINED FROM THE RAT FEMORAL MUSCLES

Vesnina L.E., Solohina I.L.

Key words: regulatory peptides, peptide complex femoral muscles, high-performance liquid chromatography.

Research Institute for Genetic and Immunological Grounds of Pathology and Pharmacogenetics, Ukrainian Medical Stomatological Academy, Poltava

This paper presents data on peptide complex substances from rat femoral muscles and determines their characteristics by using reverse-phase high-performance liquid chromatography. Chromatographic spectra of peptide complexes of femoral muscles and cortical substance of kidneys were compared. The differences in the number of fractions, their positions within chromatographic picture (hydrophobic properties) were found and described.

Ukrainian Ministry of Health Public Service,
Ukrainian Medical Stomatological Academy

Матеріал надійшов до редакції 11.12.2009