

- СТАТТІ - ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА МЕДИЦИНА

© Весніна Л.Е., Кайдашев І.П.

УДК: 616.099-092:612.112.94.015.2:612.6+612.017.1.06

УЧАСТЬ ПЕПТИДНОГО КОМПЛЕКСУ НИРОК В ПРОЦЕСАХ ФОСФОРИЛЮВАННЯ ВНУТРІШНЬОКЛІТИННИХ БІЛКІВ ЗА ЗАЛИШКАМИ ТИРОЗИНУ

Весніна Л.Е., Кайдашев І.П.

Українська медична стоматологічна академія, м. Полтава

Исследована возможность участия процессов фосфорилирования внутриклеточных белков по остаткам тирозина в реализации мембранопосредованного действия пептидного комплекса почек (ПКП) на лимфоциты. Определено заметное увеличение интенсивности экспрессии молекул фосфотирозина при 10-минутной инкубации лимфоцитов с пептидным комплексом почек, которое при предварительной стимуляции с помощью ФМА достигает максимального значения. Считаем, что пептидный комплекс почек может вовлекать процессы фосфорилирования мембранных белков лимфоцитов по остаткам тирозина для реализации своего мембранопосредованного влияния. Усиление интенсивности экспрессии фосфотирозина после 10-минутной инкубации подтверждает возможность влияния ПКП на начальные этапы сигнальной трансдукции, в частности, на активность ферментов с тирозинкиназной активностью. Более отдаленные по времени (120 минут), влияния ПКП на процессы фосфорилирования, вполне вероятно, могут свидетельствовать о влиянии ПКП на этапы сигнальной трансдукции, которые реализуются на уровне ферментативных каскадов, которые взаимодействуют с ядерными факторами транскрипции.

Регуляторні пептиди, які складають особливий клас біологічно активних речовин, є сигнальними молекулами та володіють широчайшим спектром регуляторних функцій, починаючи з регуляції окремих функцій спеціалізованих клітин, тканин, органів та систем, закінчуючи складними поведінковими актами. Регуляторним пептидам відводиться провідна роль в механізмах клітинних взаємодій, в координації процесів біосинтезу шляхом впливу на експресію генів [8, 13], якій завдяки сучасному методичному рівню досліджень вже визначено для окремих пептидних речовин – вілону та епіталону [1].

Результати досліджень дозволяють вважати, що для пептидів епіфізу (синтетичних та природних), як і більшості пептидних гормонів та інших зовнішніх стимулів неліпофільної природи, найбільш вірогідна реалізація регуляторної дії опосередковано універсальним для еукаріотів мембранно-внутрішньоклітинним механізмом [12]. Пептидному комплексу, отриманому із кіркової речовини нирок за оригінальним методом [10], притаманна мембранопосередкована дія, яка була визначена в експериментах з використанням ендогенних імуномодуляторів [4, 5]. Пептидний комплекс нирок (ПКН) володіє здатністю модулювати функціональний стан мембран лімфоцитів опосередковано зміною рівня експресії поверхневих антигенних

детермінант [3], та, вірогідно, впливати на окремі ланки початкових етапів сигнальної трансдукції [11].

Серед систем трансдукції зовнішньоклітинного сигналу всередину клітини найбільш дослідженою є система клітинних медіаторів, яка залучає фосфорилювання білків. Практично усі механізми передавання сигналу за допомогою вторинних посередників використовують зворотне фосфорилювання [7]. Фосфорилювання білків є найбільш ефективним та швидким механізмом "включення" активності білків та ферментів, які відповідають за передачу та посилення (ампліфікацію) гормонального сигналу, який передається усередину клітини [19]. Центральну роль у такій трансдукції відіграють протеїнкінази, що належать до складних ферментативних каскадів, які спроможні не тільки передавати сигнали по низці послідовних ланок, але й взаємодіяти між собою на різних ключових етапах ("горизонтальна" взаємодія каскадів) [29]. Мішенями дії таких каскадів є цитоплазматичні фактори транскрипції, які контролюють певні групи генів [21]. Продукти таких генів відповідальні за зміни метаболізму та фізіологічну активність лімфоцитів.

Фосфорилювання білків за залишками тирозину, яке регулюється узгодженою дією тирозинкіназ і тирозинфосфатаз [17], є ключовим регуляторним механізмом для різних фізіологічних процесів, таких, як рост,

диференціювання, регуляція клітинного циклу та функціонування елементів цитоскелету [23]. Існують дані щодо можливості впливу деяких регуляторних пептидів на процеси трансдукції сигналів за допомогою процесів фосфорилування. Так, ангіотензин II в епітеліальних клітинах продукує внутрішньоклітинні кальцієві сигнали та сигнали протеїнкінази C, здатний стимулювати JNK та активувати ERK двома шляхами [20]. Протимозин α у клітинних екстрактах стимулює фосфорилування фактора елонгації 2 [28].

Мета нашої роботи – визначити можливість участі процесів фосфорилування внутрішньоклітинних білків за залишками тирозину в реалізації мембраноопосередкованої дії пептидного комплексу нирок на лімфоцити.

Матеріали та методи

Пептидний комплекс отримували із кіркової речовини нирок за оригінальним методом [2]. За методом екстракцію тканин нирок проводили органічною галогенвміщуючою кислотою у присутності іонів цинку, потім пептиди осаджували органічним розчинником, та додатково очищували шляхом гель-фільтрації. Молекулярна маса пептидів становила менше 10 кДа.

Для проведення досліджень виділяли лімфоцити з венозної крові здорових донорів (віком 20-40 років) на градієнті густини фікопл-триомбрас (р=1,077 г/см³) за класичною методикою Веуот [9]. Клітини двічі відмивали у фосфатно-сольовому буфері (PBS) та ресуспензували у повному середовищі RPMI 1640 ("Flow Labs", UK) з додаванням 10% інактивованої телячої сироватки. Середню концентрацію клітин у суспензії доводили до 1×10^6 /л.

В роботі досліджено вплив ПКН на інтактні клітини, та на попередньо оброблені форбол-12-мірістат-13-ацетатом (ФМА, "Sigma"). Інкубацію лімфоцитів з ПКН проводили протягом 3, 10, 15 та 60 хвилин (контрольні клітини-1) при 37°C [24, 25]. Клітини дослідної групи після обробки ФМА в дозі $8,1 \cdot 10^{-9}$ М [22] такі ж проміжки часу, відмивали та інкубували з пептидним комплексом нирок в дозі 0,5 мкг/мл при 37°C. Паралельно досліджували лімфоцити, інкубовані з ФМА (контрольні клітини-2) за тих же умов.

Після інкубації клітини відмивали у PBS та фіксували у 100 мкл 4% розчину параформальдегіду. Пермеабілізацію мембран проводили 0,1% розчином сапоніну ("Sigma") на PBS 20 хвилин при кімнатній температурі. Лімфоцити двічі відмивали у PBS та маркували моноклональними анти-фосфотирозиновими антитілами, клон PT66 ("Sigma") та вторинними міченими флюоресцеїнізотіаціанатом (FITC) F(ab)₂-антитілами до імуноглобулінів M і G миші ("Caltag lab").

Аналіз проводили на проточному лазерному цитофлюориметрі EPIX LX MSL (Beckman Coulter, USA). За двома параметрами - переднє (FSC) та бокове (SSC) світлорозсіювання) у вікні Dot Plot виділяли зону лімфоцитів, для яких аналізували рівень інтенсивності флюоресценції по каналу FL-1. Результати визначали у вигляді однопараметричних гістограм, які відображають розподіл клітин за інтенсивністю флюоресценції FITC.

Для проведення методики дот-блотінгу лімфоцити попередньо доводили до концентрації 5×10^6 /мл в середовищі MEM та інкубували з пептидним комплексом

нирок (0,12 мкг/мл) протягом 30; 60; 90; 120 хвилин; 6 та 24 години. Потім клітин відмивали у PBS центрифугуванням 10 хв при 400g та ресуспензували у льодяному лізуючому буфері (1% Тритон-X100; 50мМ HEPES pH 7,5; 150 мМ NaCl; 1 мМ EDTA, з додаванням на 1 мл буферу – 10 мкл 200мМ фенолметилсульфонілфториду (PMSF); 10 мкл 0,1 М Na-ортованадату; 1 мкл лейпептину; 1 мкл аprotиніну; 1 мкл пепстатіну). Концентрацію клітин доводили до $0,25 \cdot 10^8$ /мл. Лізіс клітин проводили при 4°C 30 хв перемішуючі, центрифугували 30 хв при 1600g, для дослідження збирали супернатант.

З готового лізату краплі об'ємом 5 мкл наносили на смужки нітроцелюлози та висушували струменем холодного повітря. Для блокування залишкових ділянок зв'язування нітроцелюлозні смужки інкубували у трис-сольовому буфері TBS (0,05 М Трис, 0,15 М NaCl, pH 7,4) з додаванням 1% нормальної козячої сироватки проти ночі при 4°C. Відмивали смужки у TBS 5 хв. Інкубацію клітин з анти-фосфотирозиновими антитілами ("Sigma") проводили проти ночі при 4°C. Після кожної наступної інкубації смужки відмивали у відмивочному буфері TBST (TBS з додаванням 0,05% Твін-20 та 1% козячої сироватки) чотириохратно по 5 хв.

Ділянки зв'язування виявляли за допомогою екстравідін-пероксидазного методу. Для цього смужки інкубували протягом 4 годин у розчині біотинільованих антимишачих антитіл ("Sigma", 1:1000) на TBS з додаванням 1% козячої сироватки. Після відмивання проводили інкубацію 4 години у розчині екстравідін-пероксидазних антитіл ("Sigma", 1:500) на TBS з додаванням 1% козячої сироватки. Після відмивання проводили виявлення екстравідін-пероксидазних комплексів у субстратному розчині 10 хвилин (0,25 мл розчину АЕС; 4,75 мл 0,05 М ацетатного буферу, pH 5,0; 2,5 мкл 30% H₂O₂). Смужки відмивали у дистильованій воді, висушували, отримане зображення сканували.

Результати та обговорення

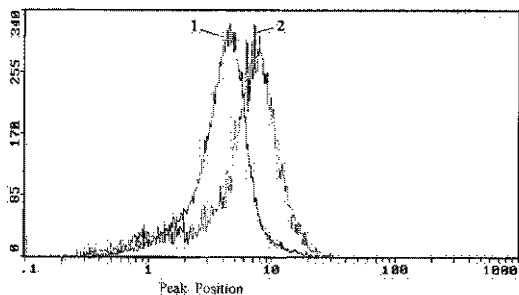
Відомо, що мембранні рецептори можуть самі являти тирозинкіназною активністю, як, наприклад, мембранні рецептори для факторів росту, які є тирозиновими кіназами, та виконують тирозинспецифічне фосфорилування, у тому числі і рецепторне аутофосфорилування [26,27]. Також вони можуть бути тісно пов'язаними з родиною Янус-кіназ JAK [14], членами родини Src [23], або ZAP-70 [18]. Рецептори тирозинкінази є ключовою ланкою інтеграції сигналів, які доставляються від різних зовнішніх або внутрішніх стимулів [29].

Згідно результатам наших досліджень, проведених на цитофлюориметрі, рівень експресії молекул фосфотирозину практично у всіх групах клітин був однаковим та складав приблизно 90-98%, що на наш погляд можна пояснити наявністю білків, які містять фосфотирозин як конституційно-експресованих білків на мембрані лімфоцитів.

Аналіз інтенсивності флюоресценції за допомогою гістограм показав, що протягом перших трьох хвилин початкова базальна інтенсивність експресії фосфотирозину практично не змінювалась. Стимуляція лімфоцитів за допомогою ФМА не виявила помітних змін, а інкубація лімфоцитів з ПКН та поєднання ФМА та ПКН

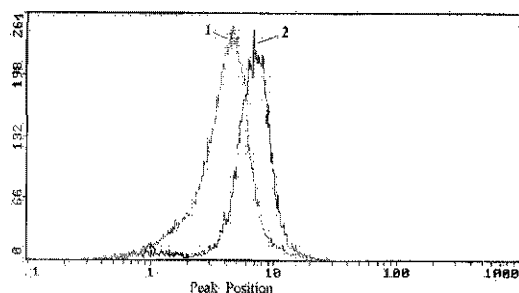
призвела до зниження інтенсивності експресії фосфотирозину в порівнянні з інтактними клітинами.

10-хвилинна інкубація з лімфоцитів з ПКН (контрольні клітини-1) характеризувалась зростанням інтенсивності експресії (гіст. 1), яка збільшувалась при попередній стимуляції ФМА до максимального рівня (гіст. 3). Контрольні клітини-2, стимульовані за допомогою ФМА, також збільшили інтенсивність експресії молекул фосфотирозину в порівнянні з інтактними клітинами (гіст. 2).



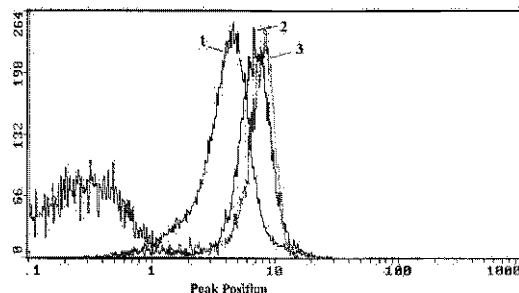
Гістограма 1.

Зміна рівня інтенсивності експресії фосфотирозину під впливом пептидного комплексу нирок в дозі 0,5 мкг/мл (інкубація 10 хв). Тут та надалі в гістограмах: По осі абсцис (FL-1) – інтенсивність зеленої флюоресценції ФІТС (вміст фосфотирозину); по осі ординат (Events) – кількість клітин з наданим рівнем флюоресценції. 1 – інтактні клітини; 2 – клітини, оброблені ПКН (0,5 мкг/мл).



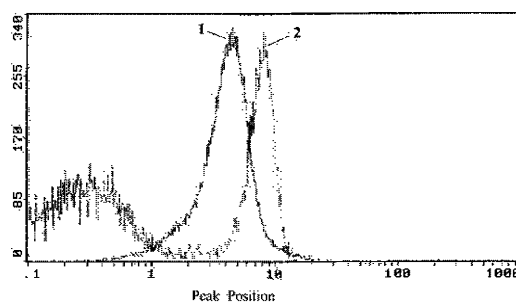
Гістограма 2.

Зміна рівня інтенсивності експресії фосфотирозину під впливом ФМА в дозі $8,1 \cdot 10^{-9}$ М (інкубація 10 хв). 1 – інтактні клітини; 2 – клітини, оброблені ФМА ($8,1 \cdot 10^{-9}$ М).



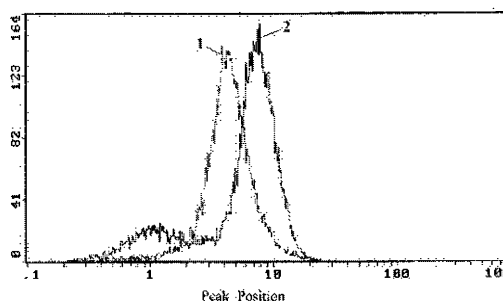
Гістограма 3.

Зміна рівня інтенсивності експресії фосфотирозину під впливом пептидного комплексу нирок (0,5 мкг/мл) при попередній обробці лімфоцитів ФМА ($8,1 \cdot 10^{-9}$ М; інкубація 10 хв). 1 – інтактні клітини; 2 – клітини, оброблені ПКН (0,5 мкг/мл) на фоні попередньої інкубації з ФМА ($8,1 \cdot 10^{-9}$ М).



Гістограма 4.

Динаміка зміни рівня інтенсивності експресії фосфотирозину під впливом ФМА та під впливом пептидного комплексу нирок (0,5 мкг/мл) при попередній обробці лімфоцитів ФМА ($8,1 \cdot 10^{-9}$ М; інкубація 10 хв). 1 – інтактні клітини; 2 – клітини, оброблені ФМА ($8,1 \cdot 10^{-9}$ М); 3 – клітини, оброблені ПКН (0,5 мкг/мл) на фоні попередньої інкубації з ФМА ($8,1 \cdot 10^{-9}$ М).



Гістограма 5.

Зміна рівня інтенсивності експресії фосфотирозину під впливом пептидного комплексу нирок (0,5 мкг/мл) при попередній обробці лімфоцитів ФМА ($8,1 \cdot 10^{-9}$ М; інкубація 15 хв). 1 – інтактні клітини; 2 – клітини, оброблені ПКН (0,5 мкг/мл) на фоні попередньої інкубації з ФМА ($8,1 \cdot 10^{-9}$ М).

15-ти хвилинна інкубація практично не вплинула на інтенсивність експресії в обох контрольних групах, але було помітним зростання експресії у клітин на фоні ПКН при попередній обробці ФМА (гіст. 5).

Таким чином, ПКН викликає помітне зростання інтенсивності експресії молекул фосфотирозину через 10 хвилин інкубації. Дія ПКН досягає максимального значення на фоні попередньої стимуляції клітин за допомогою ФМА (гіст. 4). Відомо, що додавання поліпептидних факторів росту до клітин-мішеней сприяє початку тирозин-специфічного фосфорилування білків плазматичної мембрани вже протягом перших 1-2 хвилин [15,16]. В наших попередніх дослідженнях ми використовували в більшості експериментальних серій інкубацію лімфоцитів з ПКН протягом 60 хвилин. В даному дослідженні зміни рівня інтенсивності експресії молекул фосфотирозину під впливом ПКН при інкубації протягом 60 хвилин практично не спостерігалось. Попередня стимуляція лімфоцитів ФМА незначним чином збільшувала інтенсивність експресії фосфотирозину.

Але використовуючи метод дот-блотінгу, ми отримали результат, що свідчить про можливість протікання процесів фосфорилування у лімфоцитах під впливом ПКН за більш тривалій час. В порівнянні з контролем (відсутність інкубації), найбільш інтенсивне забарвлення спостерігалось при інкубації лімфоцитів з ПКН протягом 120 хвилин, що свідчить про макси-

мальний рівень експресії внутрішньоклітинного фосфотирозину за цей час інкубації. Тривала інкубація (6 та 24 години) відзначена середньою інтенсивністю забарвлення. Дослідження клітинної лінії HPB-ALL (Т-клітинний гострий лімфобластний лейкоз) за умов культивування, показало наявність конституційно експресованих фосфорильованих білків, які ко-імунопреципітуються з молекулами ГКГС I класу: з молекулярною масою порядку 80-90, 35-40, 14-20 kD. Інкубація з ПКН показала фазні зміни експресії цих білків - переважно зниження експресії полос з м.м. 35-40 та 80-90 кДа після 6 годинної інкубації з пептидним комплексом нирок, та відновлення їх експресії після 12-годинної інкубації [6].

Не підлягає сумніву, що для клітини процеси фосфорилування є і поширеними, і важливими. Ми вважаємо, що пептидний комплекс нирок може залучати процеси фосфорилування мембранних білків лімфоцитів за залишками тирозину для реалізації свого мембраноопосередкованого впливу, а посилення інтенсивності експресії фосфотирозину після 10 хвилинної інкубації підтверджує можливість впливу ПКН на початкові етапи сигнальної трансдукції, зокрема, на активність ферментів з тирозинкіназною активністю. У той же час, більш віддаленні за часом (120 хвилин) впливи ПКН на процеси фосфорилування, цілком вірогідно, можуть свідчити про вплив ПКН на етапи сигнальної трансдукції, які реалізуються на рівні ферментативних каскадів, що взаємодіють з ядерними факторами транскрипції. Пептидні речовини здатні впливати на експресію генів ранньої відповіді, і вже встановлено специфічний вплив пептидів епіталону та вілону на експресію генів [1].

Література

1. Анисимов С.В., Бохелер К.Р., Хавинсон В.Х., Анисимов В.Н. Изучение действия пептидов вилона и эпигалона на экспрессию генов в сердце мыши с помощью технологии на основе микрочипов //Бюл. exper. биол. и мед. - 2002.- Т. 133, № 3.- С. 340-347.
2. А.С. 10180А. Україна. МКІ 5 А61 К37/00. Спосіб одержання біологічно активної речовини, що має регенераторну та модулюючу дію //Кайдашев І.П., Катрушов О.В. //Промислова власність.- 1996.- № 3.- С. 3.1.76-3.1.77.
3. Веснина Л.Э., Кайдашев И.П. Участие пептидного комплекса почек в регуляции экспрессии некоторых рецепторов лимфоцитов //Иммунология.- 1998.- N 4.- С. 13-16.
4. Веснина Л.Э., Кайдашев И.П. Экспрессия мембранных рецепторов лимфоцитов под влиянием пептидного комплекса почек на фоне действия иммуномодуляторов //Иммунология.- 1999.- № 6.- С. 36-39.
5. Веснина Л.Э., Кайдашев И.П. Особенности воздействия пептидного комплекса почек на экспрессию антигенных детерминант лимфоцитов, обработанных интерлейкином-2 и гидрокортизоном //Иммунология.- 2000.- № 2.- С. 17-21.
6. Кайдашев И.П., Ножинова О.А. Роль молекул МНС I класса на опухолевых Т-клетках в передаче пептидного сигнала //Имунология та алергологія. - 2002.- № 2.- С. 22-25.
7. Катунг Б.Г. Базисная и клиническая фармакология: в 2-х т. Т. 1 /Пер. с англ. - СПб.: Бином. - Невский диалект, 1998.- 612 с.
8. Кузник Б.И., Морозов В.Г., Хавинсон В.Х. Цитомедины: 25-летний опыт экспериментальных и клинических исследований. СПб.: Наука, 1998.- 310 с.
9. Лимфоциты. Методы. /Под ред. Дж. Клауса.- М.: Мир, 1990.- 392 с.
10. Пат. 53122А України 7 А 61К35/23. Спосіб моделювання поверхневих рецепторів лімфоцитів. - Весніна Л.Е., Кайдашев І.П. - N 2002032132; Заявл. 18.03.2002; Опубл. 15.01.2003; Бюл. № 1.
11. Регуляція активності мембрани та процесів апоптозу лімфоїдних клітин тканинними пептидами /Боброва Н.О., Весніна Л.Е., Кайдашев І.П., Квак О.В., Шликова О.А., Рябенко В.В./Під ред. І.П.Кайдашева.- Полтава:Полімет,2004.-216 с.
12. Синицкая Н.С., Хавинсон В.Х. Роль пептидов в свободнорадикальном окислении и старении организма //Успехи соврем. биол. - 2002.- Т. 122, № 6.- С. 557-568.
13. Хавинсон В.Х., Кветной И.М., Ашмарин И.П. Пептидергическая регуляция гомеостаза //Успехи соврем. биологии.- 2002.- Т. 122, №2.- С. 190-203.
14. Avalos B.R. Molecular analysis of the granulocyte colony-stimulation factor receptor //Blood.- 1996.- Vol. 88.- P. 761.
15. Deuel T.F., Huang J.S. Platelet-derived growth factor. Structure, function, and roles in normal and transformed cells //J. clin. Invest. - 1984.- Vol. 74, № 3.- P. 669-676.
16. Ek B., Westermark B., Wasteson A., Heldin C-H. Stimulation of tyrosine-specific phosphorylation by platelet-derived growth factor //Nature.- 1982.- Vol. 295.- P.419-420.
17. Hermiston M.L., Zheng Xu, Majeti R., Weiss A. Reciprocal regulation of lymphocyte activation by tyrosine kinases and phosphatases //J. clin. Invest.- 2002.- Vol. 109, № 1.- P. 9-14.
18. Hivroz C. Everything you ever wanted to know about ZAP-70 //Med. Sci. (Paris).- 2005.- Vol. 21, № 2.- P. 150-155.
19. Karelin A.A., Demidova V.S., Globa A.G. //An ASBMB Satellite of the International Congress of Biochemistry.- Seattle: Washington, 1997.- P. 56.
20. Li X., Lee J.W., Graves L.M., Earp H.S. Angiotensin II stimulates ERK via two pathways in epithelial cells: protein kinase C suppresses a G-protein coupled receptor-EGF receptor transactivation pathway //The EMBO Journal.- 1998.- V. 17.- P. 2574-2583.
21. Nel A.E. T-cell activation through the antigen receptor. Part 1: Signaling components, signaling pathways, and signal integration at the T-cell antigen receptor synapse //Journal of Allergy and Clinical Immunology.- 2002.- Vol. 109, Is.5.- P. 758-770.
22. Nishimoto Y., Onishi Y., Sato Y., Kizaki H. Protein synthesis dependent and independent apoptosis of murine splenic T cells //Bull. Tokyo dent. Coll.- 1997.- Vol.38, No.2.- P. 133-138.
23. Palacios E.H., Weiss A. Function of the Src-family kinases, Lck and Fyn, in T-cell development and activation //Oncogene.- 2004.- V. 23, № 48.- P. 7990-8000.
24. Pedersen A.E., Bregenholt S., Skov S., Vrang M-L., Claesson M.H. Protein tyrosine kinases p53/56^{lck} and p72^{syk} in MHC Class I-mediated signal transduction in B lymphoma cells //Exp. Cell Research.- 1998.- V.240.- P.144-150.
25. Ruhward M., Pedersen A.E., Mogens H., Claesson M.H. MHC Class I cross-talk with CD28 induces specific intracellular signalling and leads to Growth Retardation and apoptosis via a p56^{lck}-dependent mechanism //Exp. Clin. Immunogenet. - 1999.- V. 16.- P. 199-211.
26. Schlessinger J. Cell signaling by receptor tyrosine kinases //Cell.- 2000.- Vol. 103, № 2.- P. 211-225.
27. Simon M.A. Receptor tyrosine kinases: specific outcomes from general signals //Cell.- 2000.- Vol. 103, № 1.- P. 13-15.
28. Vega F.V., Vidal A., Hellman U., Wernstedt C., Dominguez F. Prothymosin α stimulates Ca²⁺-dependent phosphorylation of elongation factor 2 in cellular extracts //J. Biol.Chem.- 1998.- V. 273, № 17.- P. 10147-10152.
29. Weiss F.U., Daub H., Ullrich A. Novel mechanisms of PTK signal generation //Curr.Opin.Gen.Develop. - 2002.- V. 7, № 1.- P. 80-86.

Summary

KIDNEYS PEPTIDE COMPLEX INVOLVEMENT IN INTRACELLULAR PROTHEIN THYROSINE PHOSPHORYLATION PROCESSES

Vesnina L.E., Kaidashev I.P.

The intracellular protheine tyrosine phosphorylation processes involvement possibility in kidney peptide complex (KPC) membrane-like action implementation on lymphocytes is researched. The phosphotyrosine molecules intensity expression significant increasing is defined at 10-minute lymphocytes incubation with KPC, which at PMA preliminary stimulation reaches maximum value.

We consider, that KPC can attract lymphocytes membrane protheine tyrosine phosphorylation processes for its membrane-mediated influence implementation. The phosphotyrosine expression intensity intensifying after 10-minute incubation confirms KPC influence possibility on signal transduction initial stages, in particular, on enzymes activity with tyrosinkinase activity. More remote on time (120 minutes), the KPC influences on phosphorylation processes, quite probably, can testify to KPC influence on signal transduction stages, that are realized at enzymes cascades stages level, which interact with nuclear transcription factors.

Ukrainian Ministry of the Health Public Service, Ukrainian Medical Stomatological Academia,
Shevchenko Str., 23, Poltava, 36024

Матеріал надійшов до редакції 9.09.05.

© Воскресенська Л. К., Кайдашев І. П., Корнієнко В. В., Максакова О. В., Собко К. Г., Ряднова В. В.
УДК 617.713-001.4-085.31

ВПЛИВ ПОЛІПЕПТИДНОГО ПРЕПАРАТА „ВЕРМИЛАТ” НА РЕПАРАТИВНІ ВЛАСТИВОСТІ РОГОВОЇ ОБОЛОНКИ ПРИ ТРАВМАТИЧНОМУ ЇЇ ПОШКОДЖЕНІ

Воскресенська Л. К., Кайдашев І. П., Корнієнко В. В., Максакова О. В., Собко К. Г., Ряднова В. В.

Українська медична стоматологічна академія, м. Полтава

Влияние полипептидного препарата «Вермилат» на репаративные свойства роговой оболочки при травматическом её повреждении.- Работа посвящена вопросам повышения эффективности лечения травматических кератитов путём обоснованного применения полипептидного препарата «Вермилат». Работа базируется на экспериментальных исследованиях. Впервые в условиях эксперимента на моделях частичной и глубокой кератоктомий, изучена эффективность полипептидного препарата «Вермилата» как корректоров метаболизма соединительной ткани с противовоспалительным, регенераторным действием. Медицинский препарат «Вермилат», получен в Украинской медицинской стоматологической академии (патент Украины № 5743) путем экстракции из ткани кольчатых червей Eishenia foetida, который представляет собой комплекс биологически активных пептидов, молекулярной массой 10kD. В результате экспериментальных исследований установлено, что введение вермилата в дозе 0,1 мг/мл под конъюнктиву глаза, толерантно переносится структурами глаза. В проведенных сериях эксперимента, подтверждено действие полипептидного препарата, как корректора метаболизма соединительной ткани, его положительное влияние на процессы эпителизации и межклеточного взаимодействия за счет стимуляции выработки эндогенного структурного фибронектина на фоне стабильно высокого уровня гликозаминогликанов при травматических повреждениях роговицы. В ходе эксперимента был впервые разработан и применен объективный способ оценки глубины и площади изъязвления роговицы с помощью тетрациклинового теста (№99020704). Основные результаты работы, такие, как оценка уровня тканевого фибронектина при нарушениях межклеточных взаимодействий при травматических повреждениях роговицы, внедрены в научно-исследовательскую работу. Использование тетрациклинового теста с целью выявления скрытых дефектов роговой оболочки, имеющих прогностическое значение для медикаментозной коррекции травматических повреждений роговицы, нашли применение в офтальмологической практике.

Ключевые слова: травматические повреждения роговицы, пептидная регуляция.

Актуальність теми

Проблема репаративної регенерації при травматичному пошкодженні рогової оболонки на сучасному етапі залишається актуальною, тому що, внаслідок травм порушується структура рогівки, яка в 25,6% випадків приводить до інвалідності (Гундорова Р.А., 1997; Майчук Ю.Ф., 1990, Майчук Д. Ю., 1996). Останнім часом увагу вчених привертають процеси, загальною ознакою яких, є порушення стромально-епітеліальної взаємодії міжклітинного та міжтканинно-

го гомеостазу. Крім цього, активно вивчається група адгезивних молекул, зокрема фібронектина, котрі мають регуляторний вплив на процеси міжклітинної та міжтканинної взаємодії (Адамова Н.А., 1992; Брікман І.В., 1990; Хомутовський О.В., 1984). Участь переднього епітелію в утворенні міжклітинної рідини строми пояснює виснаженність міжклітинного матрикса, порушення синтезу мукополісахаридів при дефектах рогівки. В той же час регенеруюча епітеліальна тканина, яка швидко вкриває травмовану поверхню, сприяє