

Национальная академия наук Беларуси
Институт физиологии НАН Беларуси

**ЗАКОНОМЕРНОСТИ
РАЗВИТИЯ
ПАТОЛОГИЧЕСКИХ
СОСТОЯНИЙ И ИХ
КОРРЕКЦИЯ**

*Материалы международной конференции
(27-28 октября 2009 г, Минск, Беларусь)*

*Под редакцией профессоров
В.С.Улащика и В.А.Кульчицкого*

Минск
«Бизнесофсет»
2009

БЕЛКОВАЯ ФРАКЦИЯ ИЗ ПОДЧЕЛЮСТНЫХ СЛЮННЫХ ЖЕЛЕЗ УСКОРЯЕТ ЗАЖИВЛЕНИЕ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ КОЖНЫХ РАН

В.С. Лукашевич, В.Н. Никандров

Институт физиологии НАН Беларуси, Минск, Беларусь

Стимуляция процессов кожной репарации представляет собой одну из важнейших задач клинической медицины. Достаточно отметить, что повреждение 30% эпидермиса является несовместимым с жизнью. Ускорение восстановления кожи также может сократить дорогостоящее время госпитализации пациентов.

В процесс заживления ран вовлечены все уровни организации – молекулярный, субклеточный и клеточный, тканевый и органный. С общебиологической точки зрения проблема регенерации кожи сводится к ускорению процессов пролиферации и дифференциации клеток, участвующих в восстановлении эпителия рядом эндогенных регуляторов. Их спектр постоянно расширяется. Особо следует отметить в этой связи группу специфических клеточных ростовых факторов и цитокинов, реализующих свои регуляторные потенции *in situ* через собственные специфические рецепторы [1]. Механизмы регуляторного воздействия ростовых факторов на клетки-мишени в настоящее время интенсивно изучаются. Однако исследования касаются в основном одного, в крайнем случае, двух ростовых факторов, тогда как клетка имеет значительно большее число специфических рецепторов и экспонируется одновременно с множеством белков-регуляторов.

Практически все ткани организма на разных этапах онтогенеза способны синтезировать ростовые факторы и этот процесс определяется экспрессией специфических генов. Однако лишь некоторые ткани способны к синтезу нескольких ростовых факторов одновременно. К числу таких тканей относится подчелюстная слюнная железа (ПСЖ). У мышей, в отличие от других видов, этот орган гипертрофирован и составляет примерно 1% от общего веса. Причина этого феномена в настоящее время слабо выяснена. Высоким является и содержание ростовых факторов (до 0.1 мг на орган). Все это, наряду с широким представительством биологически активных полипептидов (факторы роста эпидермиса, мезодермы, эпителия, нервов, ренин-ангиотензин, эритропоэтин, соматостатин и др.) [2], представляется веским основанием для выбора подчелюстных слюнных желез в качестве источника получения препарата, содержащего все необходимые для кожной репарации вещества.

Аппликация препарата, содержащего несколько ростовых факторов и биологически активных веществ, на клеточные популяции участвующие в процессе кожной репарации может создать наиболее приемлемые условия для усиления пролиферации и/или дифференциации. Источником такой обогащенной ростовыми факторами белковой смеси может служить белковая фракция ПСЖ самцов мышей, принимающих активное участие в процессах кожной репарации [3]. При разработке метода получения белковой фракции из ПСЖ, мы преследовали цель изоляции смеси белков с ММ ~ 5 – 50 кДа, свободных от высокомолекулярных липо- и гликопротеиновых комплексов. Это обосновывается тем, что абсолютное большинство биологически активных субъединиц ростостимулирующих протеинов имеют именно этот диапазон молекулярных масс. Как правило, все они являются сложными белками, состоящими из нескольких субъединиц.

За основу разрабатываемого метода получения белковой фракции были взяты методы получения фактора роста нервов (ФРН) [2] и эпидермиса (ФРЭ) [4] из ПСЖ. ФРН имеет ММ ~140 кДа и состоит из 5 субъединиц по 26,5 кДа каждая (2-альфа, 2-гамма и 1 – бета, несущая биологическую активность) [2]. ФРЭ – представляет собой

также комплексный белок с ММ ~32 кДа, состоящий из двух субъединиц: 26 и 6 кДа, причем последняя - биологически активная /4/. Оба белка обладают способностью ускорять заживление кожных ран и хорошо экстагируются в кислой среде, распадаясь при этом на составляющие их субъединицы.

ПСЖ из 10 самцов мышей выделяли под эфирным наркозом, гомогенизировали в 15 мл 0,05М трис-НСІ буфера (рН 7,2), центрифугировали при 20 тыс. об/мин и хроматографировали на 2 колонках (2,6x60 см), заполненных Sephacryl S-200 и Тоурpearle HW-55, уравновешенных тем же буфером. Отбирали фракции, как указано на рисунке 1.

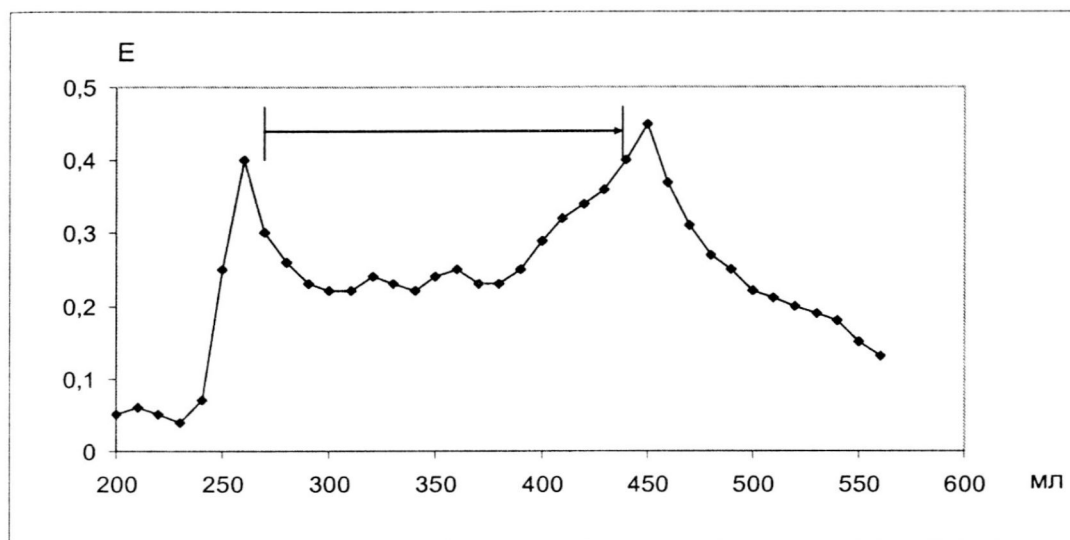


Рисунок 1 – Профиль элюции при хроматографии супернатанта гомогената подчелюстных слюнных желез из самцов мышей

Отобранные фракции концентрировали на фильтре РМ-10 ("Amicon", Голландия) до 10 мл и диализовали против 0,1М уксусной кислоты или 0,05М натрий-ацетатного буфера рН 3,5. При этом образовывался осадок, который осветляли центрифугированием при 6 тыс. об/мин в течение 30 мин. Образец подвергали хроматографии на тех же колонках, уравновешенных 0,1 М СН₃СООН или 0,05 М натрий-ацетатным буфером, рН 3,5. Собирали фракцию с ММ в пределах 5-50 кДа. Колонки предварительно были откалиброваны с использованием яичного альбумина (45 кДа) и цитихрома С (12,5 кДа). Белок определяли по соотношению абсорбции при 260 и 280 нм (табл. 1).

Таблица 1. Основные этапы получения белковой фракции из подчелюстных слюнных желез самцов мышей

№	Название образца	Объем, мл	Концентрация белка, мг/мл	Общее кол-во белка, мг
1.	Гомогенат	15	39,4	591,0
2.	Центрифугат	9	23,7	213,8
3.	Хроматография №1	180	4,85	87,3
4.	Концентрат	10	8,04	80,4
5.	Надосадочная фракция	8	3,72	29,8
6.	Хроматография №2 после диализа и центрифугирования	75	0,202	15,2

Анализ белковых фракций проводили с помощью SDS-электрофореза в 7,5% полиакриламидном геле по Weber K., Osborn M. (рис. 2).

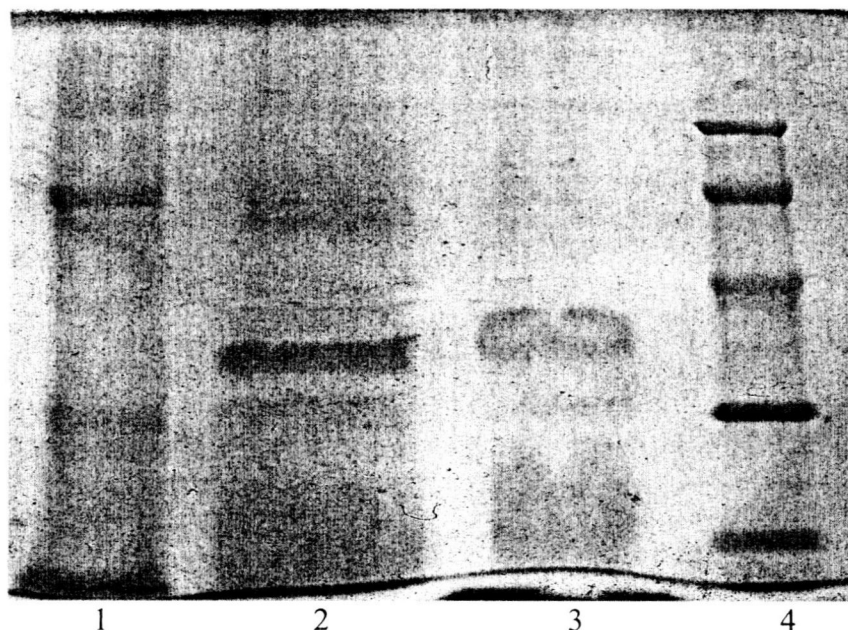


Рисунок 2 – SDS-электрофореграммы заключительных этапов получения белковой фракции из подчелюстных слюнных желез самцов мышей

Обозначения. 1 – концентрат, 2 - фракция после диализа и центрифугирования, 3 - фракция после хроматографии в 0.1 М уксусной кислоте, 4 - стандарты для SDS-электрофореза (ММ в кДа сверху вниз: 97; 66; 45; 30; 20; 14,4).

Уровень ФРН в исследуемых фракциях определяли с помощью разработанного в нашей лаборатории иммуноферментного анализа [5]. Содержание ЭФР - с помощью набора для иммуноферментного анализа фирмы Perrotech Inc. (табл. 2).

Таблица 2. Содержание фактора роста нервов и фактора роста эпидермиса в основных фракциях в процессе получения белковой фракции из подчелюстных слюнных желез самцов мышей

№	Название образца	Общее кол-во белка, мг	Содержание ФРН, мкг	Содержание ЭФР, мкг
1.	Гомогенат	591,0	540	16,5
2.	Центрифугат	213,8	315	9,63
3.	Хроматография №1	87,3	144	4,5
4.	Концентрат	80,4	54	5,0
5.	Надосадочная фракция	29,8	48	2,28
6.	Хроматография №2 после диализа и центрифугирования	15,2	0,2	0,006

Как вытекает из представленных результатов, все три исследованные фракции обладают достаточной электрофоретической гетерогенностью. Как и следовало ожидать, фракция после повторной хроматографии в 0,1М уксусной кислоте содержала, в основном, низкомолекулярные компоненты. При определении в ней ростовых факторов

было показано практически полное их отсутствие. Это может быть связано с повышенной сорбцией белков на гелевой колонке в кислых условиях. Вместе с тем кислотная экстракция кажется оправданной, поскольку при ней достигается почти 3-х кратная очистка по белку.

Для дальнейшего изучения влияния белковой фракции из слюнных желез на процесс заживления экспериментальных ран была выбрана фракция после диализа в 0,1М уксусной кислоте, поскольку она обладают высоким удельным содержанием как ФРН, так и ЭФР.

Группа беспородных белых мышей под теопенталовым наркозом подвергалась операции по удалению подчелюстной слюнной железы (сиалэктомия). Вторая группа (контрольная) была ложнооперирована. Обеим группам животных в области спины наносили резанную рану площадью примерно 1 см². Раны обрабатывали стрептоцидом и животные рассаживались в отдельные клетки. Использовали две группы сиалэктомированных животных. Первой, как и контрольной, ежедневно на протяжении 14 дней внутримышечно вводили 0,9% NaCl. Второй группе внутримышечно вводили 100 мкл стерильной белковой фракции в разведении 1:100. Раны фотографировали на 1, 3, 7 и 14 сутки и рассчитывали площадь раневой поверхности. За 100% принимали площадь изначальной раны.

На 3 сутки наблюдения у всех групп мышей образовывался сухой струп. Во 2 и 3 группах его площадь практически не отличалась от начальной. В контрольной группе наблюдалось увеличение струпа. Возможно, это связано с тем, что у некоторых животных этой группы были зафиксированы разрывы на границе между струпом и неповрежденной поверхностью кожи. К 7 суткам в контрольной группе и в группе, получавшей инъекции белковой фракции, наблюдалась значительная эпителизация, тогда как в группе сиалэктомированных животных, получавших инъекции физраствора, площадь струпа уменьшилась всего на 10%. К 14 суткам в этой группе площадь струпа составила 65% от исходной, в контроле – 32%, в группе с инъекциями белковой фракции на фоне сиалэктомии – 20% (рис. 3).

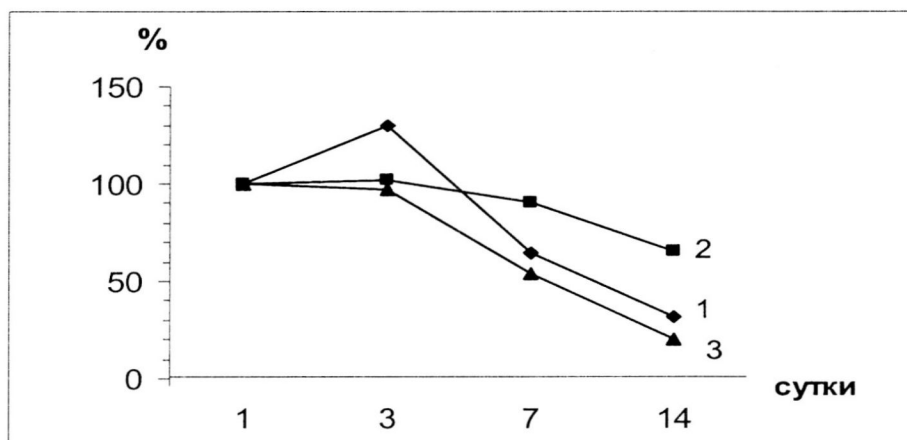


Рисунок 3 – Влияние белковой фракции из подчелюстных слюнных желез на заживление экспериментальных кожных ран

Примечание. 1 - контрольная группа (ложная операция) + физраствор; 2 - сиалэктомия + физраствор; 3 - сиалэктомия + белковая фракция.

Таким образом, полученные результаты показывают, что удаление подчелюстной слюнной железы значительно задерживает процесс кожной репарации. Инъекции белковой фракции полностью восстанавливали темп заживления ран и даже

на 12% к 14 дню наблюдения ускорили его по сравнению с контрольной группой, а по сравнению с сиалэктомизированными животными - на 69,2%. Эти результаты свидетельствуют о том, что в полученной белковой фракции содержится необходимый набор ростовых факторов и биологически активных веществ, обеспечивающих ускорение процессов кожной репарации. Белковая фракция, полученная вышеуказанным методом, после прохождения соответствующих исследований и процедур может быть использована в качестве субстанции для создания лекарственной формы ранозаживляющего действия.

Работа поддержана грантом БРФФИ Б06-70.

Литература

1. Steed D.L. // Surg. Clinics North Amer. 1997. Vol. 77, № 3. P.575–585.
2. Калюнов В.Н. Фактор роста нервной ткани / Минск: Наука и техника. 1984. 216 с.
3. Ильинский О.Б. // Бюлл. эксперим. биол. и мед. 1985. №7. С. 91–93.
4. Никольский, Н.Н., Соркин А.Д., Сорокин А.В. Эпидермальный фактор роста // Л.: Наука. 1987. 200 с.
5. Лукашевич В.С. // IX съезд Белорусского общества физиологов Минск. 1996. с. 58