



УКРАЇНА

(19) UA

(11) 43954

(13) A

(51) 6 A61K38/02

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІОПИС
ДО ДЕКЛАРАЦІЙНОГО ПАТЕНТУ
НА ВИНАХІДвидається під
відповідальність
власника
патенту(54) СПОСІБ ОТРИМАННЯ СИНТЕТИЧНИХ РЕЧОВИН ПЕПТИДНОЇ ПРИРОДИ ТА СПОСІБ
НОРМАЛІЗАЦІЇ ФІЗІОЛОГІЧНОГО СТАНУ ЛЮДИНИ ТА ТВАРИН ПРИ ЗАХВОРЮВАННЯХ

1

2

(21) 2000031506

(22) 16 03 2000

(24) 15 01 2002

(46) 15 01 2002, Бюл. № 1, 2002 р

(72) Кайдашев Ігор Петрович

(73) Кайдашев Ігор Петрович

(57) 1 Спосіб отримання синтетичних речовин пептидної природи, який включає екстракцію тканинних пептидів, дослідження амінокислотних послідовностей по методу Едмана з аналізом амінокислотного складу пептидних фракцій, синтез речовини та тестування її біологічної активності, який відрізняється тим, що амінокислотну

послідовність досліджують одночасно для всього екстракту тканинних пептидів, визначають амінокислоти, які домінують у певних положеннях амінокислотної послідовності пептидів та загальну формулу будови речовини для синтезу, включаючи до неї залишки-модифікатори

2 Спосіб нормалізації фізіологічного стану людини та тварин при захворюваннях, які викликані ендогенними або екзогенними чинниками, що включає введення в організм синтетичних речовин пептидної природи, який відрізняється тим, що як синтетичні речовини використовують речовини з запрограмованими властивостями

Винахід стосується галузі фармації та може бути використаний для синтезу нових біологічно активних речовин з метою створення лікарських препаратів, а також для нормалізації фізіологічного стану людини та тварин

Сьогодні відомо багато способів синтезу біологічно активних сполук на основі дослідження амінокислотних послідовностей реально існуючих пептидів

Відомий спосіб отримання синтетичних речовин, які входять до складу природних пептидних комплексів, виділених з кори головного мозку та епіфізу [Хавінсон В.Х., Чалисова І.І., Окулов В.Б. Исследование природных и синтетических цитомедшюв в культуре нервной ткани // Бюл. эксперим. биол. и мед. - 1998 - т. 125, №3 - С. 332-336]. Спосіб включає виділення природних тканинних пептидів шляхом екстракції, дослідження біологічної активності екстракту, виділення окремих фракцій пептидів, які входять до складу природного комплексу, дослідження амінокислотних послідовностей цих фракцій, вивчення біологічної активності фракцій, синтез штучних аналогів та проведення доклінічних іспитів, як можливих лікарських препаратів

Суттєвим недоліком такою способом є те, що при виділенні окремих фракцій пептидів, такі окремі пептиди втрачають властивості, які були притаманні цілій пептидній суміші. Найбільш бли-

зьким до способу, що заявлено, є спосіб визначення будови пептидзв'язуючої кишені молекул головного комплексу гістосумісності 1 класу для отримання синтетичних речовин пептидної природи [Rotzchke O., Falk K. Naturally-occurring peptide antigens derived from the MHC class-1 restricted processing pathway // Immunology Today - 1991 - 12, N12 - P. 447-455]. Спосіб включає, кислотну екстракцію тканинових пептидів, розчинення одержаної суміші в полярних розчинах, їх гель-фільтрацію, обернено-фазову хроматографію, дослідження амінокислотних послідовностей по методу Едмана з послідовним аналізом амінокислотного складу пептидних фракцій та математичне розрахування амінокислотної послідовності пептида з найбільшою питомою вагою у суміші та тестування її біологічної активності

Однак, цей метод також не дозволяє аналізувати амінокислотні послідовності в пептидних сумішах, де пептидні фракції входять приблизно в рівних кількостях

В основу винаходу покладено завдання отримати синтетичні біологічно активні пептиди з запрограмованими властивостями

Поставлене завдання вирішується тим, що в спосіб отримання синтетичних речовин пептидної природи, який включає екстракцію тканинових пептидів, дослідження амінокислотних послідовностей

(13) A

(11) 43954

(19) UA

по методу Едмана з послідовним аналізом амінокислотного складу пептидних фракцій, синтез речовини та тестування її біологічної активності, згідно винаходу, амінокислотну послідовність досліджують одночасно для всього екстракту тканинних пептидів, визначають амінокислоти, які домінують у певних положеннях амінокислотної послідовності пептидів та загальну формулу будови речовини для синтезу, включаючи до неї залишки-модифікатори

Спосіб здійснюють наступним чином

1 В якості субстрата використовується екстракт тканинних пептидів, отриманий будь-яким відомим чи знов розробленим методом, який володіє чи може володіти корисними властивостями. Екстракт тканинних пептидів розчиняють в дистильованій воді та відокремлюють речовини з молекулярною масою більше 10 kD

2 Проба екстракту, який містить пептиди з молекулярною масою менше 10 kD, аналізується методом високо-ефективної рідинної хроматографії для підтвердження пептидної природи речовин, які входять у суміш

3 Аліквота екстракту відбирається для проведення визначення амінокислотної послідовності за методом Едмана

4 Після проведення визначення амінокислотної послідовності (згідно п 3) результати обробляються для визначення амінокислот, які домінують у певних положеннях амінокислотної послідовності пептидів, які входять до суміші, що аналізується

5 На основі визначення домінуючих амінокислот та їх послідовності визначається загальна формула будови синтетичного пептида-аналога

6 Для надання синтетичному пептиду-аналогу корисних властивостей до формули будови синтетичного пептида-аналога включають залишки-модифікатори

7 Досліджують біологічну активність пептидів-аналогів чи тестують корисні властивості

Приклад

Створення синтетичних пептидів-аналогів природного пептидного комплексу нирок

Для здійснення способу береться екстракт тканинних пептидів отримання з ниркової тканини за методом [10180A 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]

Розчиняють пептидний комплекс в дистильованій воді, яка містить 0,1% трифтороцтової кислоти. Не розчинний матеріал видаляють центрифугуванням при 3000g протягом 15 хвилин. Розчин пептидного комплексу наносять на патрон "Centricon-10" (Amicon, USA) та відсепаровують матеріал з молекулярною вагою більше 10kD

Розчин пептидів нирок (M < 10000) аналізують на автоматичному секвенаторі 120A "Applied Biosystems" (USA)

В результаті аналізу отримані наступні дані

Таблиця 1
Аналіз амінокислотної послідовності суміші природних пептидів нирки за методом Едмана

Pmol	A	D	E	F	G	H
1	797 70	413 33	728 03	661 46	858 89	133 72
2	750 22	<u>575 75</u>	<u>904 19</u>	297 13	579 91	218 25
3	583 35	482 71	675 89	146 41	<u>651 77</u>	245 89
4	476 24	<u>531 60</u>	556 21	96 84	538 42	<u>248 22</u>
5	401 72	478 15	448 13	55 19	410 81	234 24
6	379 99	396 89	314 38	46 21	339 10	171 74
7	286 81	286 01	237 49	37 13	271 81	131 78
8	218 51	186 54	176 55	29 31	39 59	111 73
9	175 27	128 88	131 60	23 43	185 48	94 32
10	136 27	93 95	105 30	18 42	161 86	66 53

Pmol	I	K	L	M	N	P
1	872 23	838 89	130 25	161 00	118 78	98 79
2	770 56	<u>1010 19</u>	114 34	99 01	<u>196 25</u>	400 46
3	414 25	<u>1233 63</u>	106 88	89 96	<u>195 08</u>	<u>1095 40</u>
4	210 02	<u>1158 24</u>	101 59	68 54	161 34	827 16
5	178 45	989 67	97 67	43 14	120 41	534 46
6	143 35	803 96	94 78	36 76	99 79	356 51
7	110 97	680 04	83 52	25 09	80 64	286 95
8	75 61	463 61	81 14	22 51	52 53	230 66
9	59 28	372 11	73 90	15 86	37 67	181 84
10	52 03	271 66	66 95	12 57	29 00	146 38

Продовження таблиці 1

Pmol	Q	R	S	T	V	W	Y
1	169 61	356 12	257 152	259 67	887 56	89 36	691 52
2	332 40	4 11	204 76	240 65	968 42	56 70	456 68
3	309 94	495 93	120 36	160 58	539 46	43 36	258 63
4	284 93	539 15	101 76	155 13	308 29	32 72	171 34
5	219 79	560 15	94 43	126 79	284 37	21 87	92 75
6	179 15	593 78	74 71	102 03	248 60	17 56	68 34
7	150 80	554 06	61 77	30 00	183 58	12 13	49 33
8	111 30	454 10	45 84	61 30	147 22	9 62	34 03
9	82 66	336 24	38 60	49 67	94 08	7 28	27 37
10	60 00	243 32	29 33	30 00	72 81	5 62	20 19

Примітка підкреслено домінуючу амінокислоту

В разі відсутності закономірностей в розміщенні амінокислоти в той чи іншій позиції пептидів в суміші спостерігається зменшення концентрації амінокислоти від першої до останньої позиції (див аланін, фенілаланін, ізолейцин і т.і.), в разі якщо амінокислота переважно займає одну з позицій, порушення зменшення концентрації цієї амінокислоти. Перша позиція складна для заключення тому що відсутній попередній цикл. Наприклад, аспарагінова амінокислота (одноптерний код -D) переважно зустрічається в 2 та 4 позиції амінокислотної послідовності пептидів, що знаходяться в суміші, глутамінова кислота в 2 позиції. В кількісному відношенні можна також оцінити такі виділені амінокислоти як домінантні, сильні та слабкі.

В таблиці 2 надана загальна схема будовання пептидів виділених з коркової речовини нирок.

Таблиця 2

Загальна схема будовання пептидів виділених з коркової речовини нирок

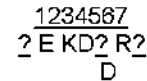
	Позиція амінокислот в пептиді							
	1	2	3	4	5	6	7	8
Домінантні залишки	V	E D	K	D		R		
Сильні залишки			G	H				
Слабкі залишки	V		P			R		T

Залишками, що домінують, є валін, аспарагінова та глутамінова кислоти в позиції 2, лізін - в 3, аспарагінова кислота - в 4, і арпін - в 6 позиції. Крім того заслуговує обговорення переважне розташування проліну в 2 та 3 позиції, що таке термінальне розташування проліну захищає епітоп від деградації під дією екзопептидаз.

На підставі будови реальних білків нами запропонована модель пептида-аналога пула пептидів, виділених з тканин нирок в першій позиції знаходиться люба амінокислота (можливо пролін для захисту епітопа), в 2 позиції - глутамінова або аспарагінова кислоти, в 3 - лізін, в 4 - аспарагінова кислота або пистидін, в 5 - люба, в 6 - арпін, в 7 - люба амінокислота. В якості будь-якої амінокисло-

ти частіш використовують неполярні незаряджені амінокислоти.

З цією метою за допомогою формули будовання пептидів нирки



на обладнанні фірми "Applied Biosystems" (США) були синтезовані такі пептиди:

Про-Глу-Лиз-Асп-Лей-Арг-Лиз- P E K D L R K

Про-Глу-Лиз-Асп-Сер-Арг-Лиз- P E K D S R K

Про-Глу-Лиз-Асп-Асп-Арг-Лей- P E K D D R L

В першому положенні розташований пролін для надання пептидам стійкості в організмі до дії протеолітичних ферментів.

Дослідження біологічної активності синтетичних пептидів та порівняння їх активності з природним пептидним комплексом нирок

Біологічна активність пептидів-аналогів досліджувалась нами на моделі аутоімунного нефриту Хеймана та порівнювалась з активністю природного пептидного комплексу нирок. Всі тварини були розподілені на 6 груп. 1 - інтактні тварини, 2 - контрольні (аутоімунний нефрит з введенням фізіологічного розчину), та дослідні з введенням синтетичних пептидів, 3 група - PEKDSRK, 4 група - PEKDLRK, 5 група - PEKDDRRL, 6 група - природний пептидний комплекс нирок (ППКН). Пептиди вводили 6 діб внутрішньом'язово в дозі 0,1 мг/кг в 0,2 мл стерильного фізіологічного розчину починаючи з 15 доби після початку індукції нефриту. Препарат вводили 7 діб, дослідження тварин проводили за 3 доби після останнього введення.

Дослідили вплив пептидного препарату нирок, та його синтетичних аналогів на деякі показники гемостазу при розвитку аутоімунного нефриту у щурів, які викладено у таблиці 3.

Як показали наші дослідження, у щурів лінії Wistar розвиток нефриту приводив до зростання рівня лейкоцитів та сегментоядерних нейтрофілів, зниження фагоцитарної активності нейтрофілів, послаблення активності ЛКБ. Зменшувалась кількість еритроцитів, та вміст гемоглобіну в периферичній крові.

У тварин, що одержували природний пептидний комплекс, кількість лейкоцитів була вище показників здорових тварин.

Таблиця 3

Зміни гематологічних та імунологічних показників у щурів при розвитку аутоімунного нефриту під впливом пептидного комплексу нирок та його синтетичних аналогів

Показники, що досліджувались	Статні показники	Інтактні тварини	Аутоімунний нефрит	Тварини з аутоімунним нефритом, яким вводили пептиди			
				Пептид PEKDS-RK	Пептид PEKDL-RK	Пептид PEKDD-RL	ППКН
1	2	3	4	5	6	7	8
Лейкоцити, $10^9/\text{л}$	M	5,77	10,60	6,26	7,06	3,82	9,15
	M	0,99	4,66	1,27	1,27	0,52	1,04
	P		>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05
	P ₁			>0,05	>0,05	<0,05	>0,05
	P ₂				>0,05	>0,05	>0,05
	P ₃					<0,05	>0,05
	P ₄						<0,05
Еритроцити $10^{12}/\text{л}$	M	6,00	4,33	6,80	6,40	6,20	8,07
	M	1,01	1,46	1,55	0,95	0,55	0,63
	P		>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05
	P ₁			>0,05	>0,05	>0,05	>0,05
	P ₂				>0,05	>0,05	>0,05
	P ₃					>0,05	>0,05
	P ₄						>0,05
Лімфоцити, %	M	65,00	60,00	47,30	56,30	71,00	62,20
	M	4,35	0,65	4,37	9,89	5,05	7,26
	P		>0,05	<0,05	<0,05	>0,05	<0,05
	P ₁			<0,05	<0,05	>0,05	>0,05
	P ₂				>0,05	<0,05	>0,05
	P ₃					>0,05	>0,05
	P ₄						>0,05
Сегментоядерні нейтрофіли, %	M	31,70	36,30	49,60	36,60	22,00	32,70
	M	4,66	1,85	4,48	8,95	4,76	6,82
	P		>0,05	<0,05	>0,05	>0,05	>0,05
	P ₁			>0,05	>0,05	>0,05	>0,05
	P ₂				<0,05	>0,05	>0,05
	P ₃					>0,05	>0,05
	P ₄						>0,05
Гемоглобін, г/л	M	139,00	136,60	150,60	136,60	131,00	137,50
	M	13,50	12,80	20,70	5,90	4,60	13,10
	P		>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05
	P ₁			>0,05		>0,05	>0,05
	P ₂					>0,05	>0,05
	P ₃					>0,05	>0,05
	P ₄						>0,05
Фагоцитарна активність, %	M	62,80	44,70	61,00	46,70	62,80	31,00
	M	11,60	12,20	16,50	7,42	8,15	7,76
	P		>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05
	P ₁			>0,05	>0,05	>0,05	>0,05
	P ₂				>0,05	>0,05	>0,05
	P ₃					>0,05	>0,05
	P ₄						<0,05

Продовження таблиці 3

Фагоцитарне число, Од	M	5 70	3 10	4 60	3 40	4 70	2 40
	M	0 75	0 55	1 55	0 63	0 98	0 41
	P		<0 05	>0 05	>0 05	>0 05	<0 05
	P ₁			>0 05	>0 05	>0 05	>0 05
	P ₂				>0 05	>0 05	>0 05
	P ₃					>0 05	>0 05
	P ₄						>0 05
КонА-РБТЛ, Ін Стимуляц	M	5 80	4 50	7 80	7 00	5 60	5 40
	M	1 93	1 50	0 90	0 79	0 55	1 48
	P		>0 05	>0 05	>0 05	>0 05	>0 05
	P ₁			>0 05	>0 05	>0 05	>0 05
	P ₂				>0 05	>0 05	>0 05
	P ₃					>0 05	>0 05
	P ₄						>0 05
ЛКБ, СЦК	M	1 50	0 77	0 60	0 86	1 13	1 05
	M	0 20	0 23	0 12	0 22	0 35	0 09
	P		>0 05	<0 05	>0 05	>0 05	>0 05
	P ₁			>0 05	>0 05	>0 05	>0 05
	P ₂				>0 05	>0 05	<0 05
	P ₃					>0 05	>0 05
	P ₄						>0 05

Примітки тут і далі

1 р – порівняння статистичних показників проведено з інтактними тваринами,

2 р₁ – порівняння статистичних показників проведено між контрольною групою та дослідними тваринами,3 р₂-р₄ – порівняння статистичних показників між дослідними тваринами

Кількість сегментоядерних нейтрофілів залишалась в межах норми. Зростало число еритроцитів без адекватного збільшення гемоглобіну в них. Фагоцитарна активність та фагоцитарне число були нижче показників усіх груп. Індекс бласттрансформації залишався в межах норми.

При введенні тваринам пептида PEKDSRK, були виявлені наступні зміни. Зменшувалась кількість лейкоцитів відносно контрольної групи. Збільшувалась кількість еритроцитів та вміст гемоглобіну в периферичній крові. Фагоцитарна активність та фагоцитарне число зростали в порівнянні з показниками контрольних тварин, індекс бласттрансформації був найвищий серед усіх груп.

У тварин, які одержували пептид PEKDLRK, були виявлені наступні зміни. Знижувалась кількість лейкоцитів відносно контрольної групи, і ставала вище показників здорових тварин. В лейкоформулі спостерігались зрушення в бік збільшення числа сегментоядерних нейтрофілів при низькому рівні лімфоцитів. Цитохімічний коефіцієнт ЛКБ в нейтрофільних лейкоцитах був нижче показників здорових тварин на фоні збільшення фагоцитарної активності. Індекс бласттрансформації перевищував показники інтактних тварин.

У тварин, які отримували пептид PEKDDRL, зменшувалась кількість лейкоцитів в периферичній крові, на фоні збільшення кількості лімфоцитів. Кількість еритроцитів залишалась в межах норми, але зменшувалась вміст гемоглобіну в них. Індекс бласттрансформації і фагоцитарна активність нормалізувались.

Використання біологічно активних синтетичних речовин пептидної природи може бути здійснено для нормалізації фізіологічного стану людини та тварин.

Відомі способи використання біологічно активних речовин для лікування захворювань. Використовують в якості продуцентів біологічно активних речовин клітинні суспензії [№ 94020324 18 10 93 МКІ⁵ А61К35/407 Лікарський препарат імунотропічної дії на основі клітинної суспензії та спосіб лікування цукрового діабету з використанням цього препарату]. Застосовують пептидний препарат тимусу тималін для нормалізації стану імунної системи при туберкульозі легень [№ 6098 А1 149/517 29 12 94 4298215/SU МКІ⁴ А61К35/26, А61В5/00 Спосіб попередження розвитку туберкульозу легень /Чернушенко К.Ф., Кочосова Л.С., Ільницький І.Г., Гончарова С.І., Коваленко М.М. та ін.]

Суттєвими недоліками цих способів є введення крім активно діючих речовин баластних речовин, які мають небажані ефекти (токсична, алергізуюча для тощо).

Найбільш близьким до способу що заявлено, є спосіб лікування синдрому набутого імунodefіциту (ВІЛ-інфекції) з використанням препарату імунотропічної дії [МКІ⁵ А61К35/407 Заяв. №94061620 від 14 12 93 Лікарський препарат імунотропічної дії на основі клітинної суспензії та спосіб лікування синдрому набутого імунodefіциту (ВІЛ-інфекції) з використанням цього препарату /Смикодуб О.І., Марков І.С., Пилипчук О.М. //Промислова власність. Офіційний бюлетень-1995 -№3 -С 2 11-2 12], який включає введення біологічного матеріалу імунотропічної дії на ґрунті клітинної суспензії, виготовленої з нативних або криоконсервованих гемопоетичних клітин ембріональної печінки та/або селезінки, в цій суспензії кількість ядромісних клітин повинно бути 5-200*10⁶/мл, колонієутворюючих одиниць грануломоноцитарного ряду від 20 до 200*10³/мл, кількість бластів від 0,5 до 10*10³/мл. Лікарський препарат вибирають з сформованого

тканинного банку з урахуванням індивідуальних показників хворого

Однак цей спосіб не дозволяє отримати високу терапевтичну активність внаслідок наявності значної кількості баластних речовин та не забезпечує точності дозування

Суттєвим недоліком цього способу є високий рівень побічної дії, який обумовлений баластними речовинами. В основу винаходу покладено завдання знизити рівень побічної дії біологічно активних речовин та підвищити їх терапевтичну активність

Поставлене завдання вирішується тим, що в спосіб нормалізації фізіологічного стану людини та тварин в якості синтетичних речовин використовують речовини з запрограмованими властивостями, отримані згідно заявленого способу

Рівень побічної дії біологічно активних речовин знижується при використанні, отриманих згідно винаходу, синтетичних пептидів внаслідок відсутності в їх складі баластних речовин, а терапевтична активність зростає завдяки використанню синтетичних пептидів із запрограмованими властивостями, що робить застосування пептидів спрямованим на чітко визначені порушення фізіологічного стану. Спосіб здійснюють наступним чином

1 Визначають порушення фізіологічного стану організму людини та тварин при захворюваннях

2 Вибирають синтетичні пептиди з запрограмованими властивостями, які відповідають визначеним порушенням фізіологічного стану організму при захворюваннях

3 Вводять підібрані синтетичні пептиди в організм відомими шляхами до нормалізації показників фізіологічного стану організму

Приклад

Ми дослідили зміни показників ПОЛ у тварин з аутоімунним нефритом (табл. 4)

При розвитку патології зменшувалось накопичення МДА при високій активності СОД, що свідчило про зниження активності транспортних процесів в нирках

При введенні таким тваринам природнього комплексу нирок та його синтетичних аналогів (PEKDSRK, PEKDLRK та PEKDDRL) рівень накопичення МДА в тканинах нирок нормалізувався

Активність СОД ще більше підвищувалась у групах, які отримували пептиди PEKDDLRL та PEKDDRL, а природний пептидний комплекс нирок та його синтетичний аналог PEKDSRK знижували цей показник до нормальних значень

Таблиця 4

Зміни перекисного окислення ліпідів в тканині нирки при дії пептидного комплексу нирок та його синтетичних аналогів при аутоімунному нефриті у щурів

Показники, що досліджувались	Статні показники	Інтактні тварини	Тварини з аутоімунним нефритом, та введенні пептидів				
			Аутоімунний нефрит	Пептид PEKDS-RK	Пептид PEKDL-RK	Пептид PEKDD-RL	ППКН
1	2	3	4	5	6	7	8
МДА в тканині нирки % накопичення	М	77 25	67 00	179 00	180 00	129 50	141 50
	М	24 60	14 80	33 80	17 00	2 60	23 90
	Р		>0 05	>0 05	<0 05	>0 05	>0 05
	P ₁			<0 05	<0 05	<0 05	>0 05
	P ₂				>0 05	>0 05	>0 05
	P ₃					>0 05	>0 05
СОД в тканині нирки (Од)	М	1 80	2 10	1 90	2 29	2 60	1 90
	М	0 04	0 55	0 005	0 13	0 38	0 16
	Р		>0 05	>0 05	<0 05	<0 05	<0 05
	P ₁			>0 05	>0 05	>0 05	>0 05
	P ₂				<0 05	>0 05	>0 05
	P ₃					>0 05	>0 05
	P ₄						>0 05

Нами була досліджена видільна функція нирок у тварин з аутоімунним нефритом (табл. 5)

Таблиця 5

Зміни видільної функції нирок під дією ППКН та його синтетичних аналогів при аутоімунному нефриті у щурів

Показники, що досліджувались	Статні показники	Інтактні тварини	Тварини з аутоімунним нефритом, та введенні пептидів				
			Аутоімунний нефрит	Пептид PEKDS-RK	Пептид PEKDL-RK	Пептид PEKDD-RL	ППКН
1	2	3	4	5	6	7	8
Креатинін мкмоль/л	M	71 50	103 70	66 40	69 30	77 80	82 90
	m	4 20	1 70	4 20	3 00	4 00	4 70
	p ₁			>0 05	>0 05	>0 05	>0 05
	p ₂			<0 05	>0 05	>0 05	<0 05
	p ₃				>0 05	>0 05	>0 05
	p ₄					>0 05	>0 05
Сечовина ммоль/л	M	5 65	10 99	8 46	8 36	5 29	5 70
	m	1 88	2 77	2 29	2 42	1 77	2 03
	p ₁		<0 05	>0 05	>0 05	>0 05	>0 05
	p ₂			>0 05	>0 05	<0 05	<0 05
	p ₃				>0 05	>0 05	>0 05
	p ₄					>0 05	>0 05

При дослідженні стану нирок ми знайшли суттєві зміни показників, що досліджувалися. Розвиток аутоімунного нефриту призвів до порушення екскреторної функції нирок - зростала кількість креатинину та сечовини в сироватці крові. Введення всіх пептидних препаратів, що досліджувалися, призвело до покращення показників екскреції, але

лише в 5 та 6 групах ці зміни були вірогідні (відповідно, пептид PEKDDRL та ППКН)

В цьому експерименті ми дослідили також показники зміни ваги тіла тварин та коефіцієнтів мас органів, при розвитку аутоімунного нефриту у щурів (табл. 6)

Таблиця 6

Зміни маси тіла щурів та коефіцієнтів мас органів при аутоімунному нефриті

Показники, що досліджувались	Статні показники	Групи тварин					
		Інтактні тварини	Контрольні тварини	Пептид PEKDS-RK	Пептид PEKDL-RK	Пептид PEKDD-RL	ППКН
1	2	3	4	5	6	7	8
Коефіцієнт маси нирок	M	0 0067	0 0069	0 0072	0 0080	0 0069	0 0078
	m	0 0003	0 0008	0 0007	0 0004	0 0002	0 0010
	p ₁		>0 05	>0 05	>0 05	>0 05	>0 05
	p ₂			>0 05	>0 05	>0 05	>0 05
	p ₃				>0 05	>0 05	>0 05
	p ₄					>0 05	>0 05
Коефіцієнт маси тимусу	M	0 00082	0 00110	0 00140	0 00150	0 00110	0 00110
	m	0 00005	0 00001	0 00005	0 00008	0 00001	0 00003
	p ₁		>0 05	<0 05	<0 05	<0 05	>0 05
	p ₂			>0 05	<0 05	<0 05	>0 05
	p ₃				>0 05	<0 05	>0 05
	p ₄					<0 05	>0 05

Продовження таблиці 6

Коефіцієнт маси нирок	M m p p ₁ p ₂ p ₃ p ₄	0 0037 0 0005	0 0045 0 0010 >0 05	0 0047 0 0005 >0 05 >0 05	0 0085 0 0008 <0 05 <0 05 <0 05	0 0052 0 0007 >0 05 >0 05 >0 05 <0 05	0 0046 0 0006 >0 05 >0 05 >0 05 <0 05 >0 05
Вага тіла тварини	M m p p ₁ p ₂ p ₃ p ₄	224 90 13 35	219 65 16 35 >0 05	262 95 24 35 >0 05	135 80 10 20 <0 05 <0 05 <0 05	204 52 9 20 >0 05 >0 05 >0 05 <0 05	229 55 9 25 >0 05 >0 05 >0 05 <0 05 >0 05

Як показали наші дослідження при розвитку патологічного процесу знижувалась маса тіла щурів та зростали коефіцієнти мас нирок, тимусу та селезінки

При введенні таким тваринам природнього пептидного комплексу нирок коефіцієнт маси нирок підвищувався. Вага тіла наближувалась до показників здорових тварин

При введенні пептида PEKDSRK зростає коефіцієнт маси нирок, тимусу та селезінки відносно контрольних тварин, та вага тіла

Пептид PEKDLRK призводив до збільшення коефіцієнта мас нирок, тимусу й селезінки, при цьому зареєстровано зменшення ваги тіла тварин відносно контрольної групи

При введенні пептида PEKDDRL збільшувався коефіцієнт маси селезінки, коефіцієнти мас нирок та тимуса залишалися на рівні контрольних тварин. Вага тіла тварин зменшувалась в незначній мірі відносно контрольної групи

Таким чином, у всіх досліджуваних пептидів виявлявся терапевтичний ефект, але в різному ступені. Пептид PEKDLRK стимулював бласттрансформацію та фагоцитарну активність нейтрофілів. Пептид PEKDSRK підсилював не тільки продукцію еритроцитів, але й процентний вміст гемоглобіну в них, а також стимулював бласттрансформацію і фагоцитарну активність нейтрофільних лейкоцитів. Пептид PEKDDRL підсилював продукцію лімфоцитів. Як видно з наведених результатів найбільшою терапевтичною активністю володів пептид PEKDDRL, решта пептидів мали проміжний по силі вплив.

Маса нирок під час розвитку патології та експериментальної терапії суттєво не змінювалась. Тільки пептид PEKDLRK істотно впливав на масу тимуса та селезінки, підвищуючи їх.

З метою підтвердження лабораторного вивчення терапевтичної активності пептидів, що досліджувалися, було проведено гістологічне дослідження тканин нирок.

Як показало дослідження в тканинах інтактних тварин спостерігалось помірне набухання клубочків, повнокров'я судин дрібного капітру, потовщення стінок окремих артерій, що може бути пов'язано з віковими змінами та впливом наркотичних речовин, які використовували під час забою.

Розвиток експериментальної патології (авто-

мунного нефриту) призводив до виникнення запально-некротичних змін в паренхімі нирок. Велика частина гломерул з некрозом та папінозом капілярних петель. Виявлялися ділянки масивної мононуклеарної інфільтрації, особливо навкруги каналців, стінки артерій набухли, розрихлені з ділянками руйнації базальної мембрани, вени розширені з підвищеним кровонаповненням. В гломерулах зустрічаються явища проліферації епітелію з утворенням "напівмісяців", деякі клубочки сегментовані. Відмічено численні поля некрозу клітин проксимальних каналців, глибока дистрофія клітин дистальних каналців. В багатьох каналцях циліндри. Практично відсутня цитоплазма клітин за рахунок клазматозу. В області збіральних трубочок, петлі Генле значна лімфопістотитарна інфільтрація. На границі коркової та мозкової речовини спостерігається розширення судин - артерій та вен. Зустрічаються пристіночні тромби. Стінки артеріол та дрібних артерій незначно інфільтровані мононуклеарами. Після введення тваринам пептидного комплексу нирок зникали явища некрозу гломерул та каналців, спостерігали досить чітке розмежування коркової та мозкової речовини, але лишалися ділянки глибоких дистрофічних процесів у вигляді папіново-крапельної дистрофії, склерозу. Клубочки помірно кровонаповнені, базальна мембрана практично не змінена. Цитоз клубочків 80-90, зрідка зустрічаються у окремих тварин явища вакуолізації ендотелію клубочків. Відмічено незначну періваскулярну інфільтрацію мононуклеарами. Коркова речовина з ознаками повнокров'я. Розширені міжканальцеві капіляри. В клітинах проксимальних каналців помірні явища зернистої дистрофії, зрідка клазматоз.

При введенні таким тваринам пептиду PEKDSRK ми спостерігали не чітку межу між корковою та мозковою речовиною, незначну лімфопістотитарну інфільтрацію у цій зоні, основна маса клубочків була розташована в корковій речовині. Клубочки були крупні, більшість з них заповнювала всю капсулу. Капілярні петлі клубочків впритул прилягали до зовнішнього листка капсули, майже заглиблюючись в нього, що ускладнює дослідження базальної мембрани. Знайдено помірну вакуолізацію ендотелію клубочків. В проксимальних каналцях помірні зміни (деякі клітини набрякли, в частині зерниста дистрофія). Спостерігалась помі-

рна дифузна інфільтрація міжканальцевих просторів мононуклеарами та гістоцитами. В зоні розташування дистальних каналців знайдено повнокров'я капілярів, клазматоз в клітинах каналців.

Після введення пептиду PEKDLRK спостерігали трохи стерту межу між корковою та мозковою речовиною. Клубочки займали 2/3-3/4 об'єму капсули, просвіт капсул вільний. Базальна мембрана трохи набрякла. В проксимальних каналцях незначний набряк клітин, клазматоз апікальної частини. Зрідка зустрічаються клубочки з розширеними капілярними петлями, які займають майже всю капсулу. В цілому спостерігаються незначні зміни структури нирок. У тварин, які отримували пептид PEKDDRL спостерігалися клубочки відносно не

змінені. Знайдено помірне розширення капілярної мережі, особливо на межі коркової та мозкової речовини. Простір дистальних каналців розширений, деякі каналці з ознаками зернистої дистрофії. Гістологічна структура практично відповідає картині здорових тварин. Отже введення всіх пептидів викликало в різному ступені нормалізацію морфологічної структури нирок, найбільш активними були пептиди PEKDLRK та PEKDDRL.

Таким чином, синтетичні пептиди, які були отримані запропонованим методом, мали виражену біологічну активність, яка співпадала, а в ряді випадків перевершувала, активність природного пептидного комплексу нирок.