

ИЗУЧЕНИЕ БЕЛКОВЫХ КОМПОНЕНТОВ ПЕПТИДНЫХ РЕГУЛЯТОРОВ ПРИРОДНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ

Г.А.Рыжак, П.А.Некрасов*, О.И.Киселев*, В.Х.Хавинсон

*Санкт-Петербургский институт биорегуляции и геронтологии СЗО РАМН;
НИИ гриппа РАМН, Санкт-Петербург

Контролю безопасности лекарственных препаратов, в производстве которых используется сырье животного происхождения, должно уделяться особое внимание. При производстве цитомединов и цитаминов используется технология обработки органов и тканей молодых животных, обеспечивающая полное отсутствие в препаратах инфекционных агентов, протоонкогенов, нуклеиновых кислот и прионных белков, что подтверждено результатами исследования препаратов методами, рекомендованными ВОЗ.

Ключевые слова: прионные белки, протоонкогены, гистохимия, иммуноблоттинг

Природное сырье животного происхождения может включать в себя инфекционные агенты, протоонкогены, нуклеиновые кислоты. В последние годы привлекли к себе внимание прионные инфекции, в этиологии которых определенное место отводится прионам — специфическим инфекционным белкам, относящимся к амилоидам [1, 2, 6, 9]. В связи с этим при производстве препаратов, выделенных из органов и тканей животных, повышенное внимание уделяется проблемам очистки активной субстанции от нежелательных примесей, и в первую очередь — инфекционных агентов.

В Санкт-Петербургском институте биорегуляции и геронтологии СЗО РАМН разработано 2 класса препаратов природного происхождения — цитомедины (лекарственные препараты) и цитамины (парафармацевтики) [3, 5].

Целью настоящего исследования был анализ компонентного состава цитомединов и цитаминов для подтверждения отсутствия их контаминации функционально активными протоонкогенами, жизнеспособными вирусами и прионными белками.

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

Технология производства цитомединов и цитаминов обеспечивает максимальную защиту препаратов от попадания инфекционных агентов.

Процесс выделения активной субстанции из органов и тканей животных проводится при 3–7°C и pH 3.0 в течение 6 дней. Эти условия достаточны для полной инактивации практически всех вирусов, даже без дополнительных воздействий [8].

Экспертную оценку контаминации пептидных регуляторов нуклеиновыми кислотами проводили методом фенольно-детергентной экстракции нуклеиновых кислот из препарата с последующим электрофорезом в 1% агарозном геле в трис-ацетатном буфере (окрашивание бромистым этидием) [4].

С целью подтверждения отсутствия в пептидных регуляторах прионных белков методами гистохимии, электронной микроскопии, электрофореза и иммуноблоттинга изучали сконцентрированные в 200 раз образцы препаратов.

Для предварительной оценки количества содержащихся в препаратах белков и определения их молекулярной массы использовали электрофорез исследуемого препарата в ПААГ, который проводили по стандартной методике.

Для первичного скрининга прионных инфекций использовали гистохимический метод, основанный на окрашивании исследуемого препарата конго красным и позволяющий выявить наличие в препарате белков класса амилоида, в том числе и прионов.

Цитомедины и цитамины являются водорастворимыми препаратами, поэтому образцы фиксировали не на стекле, а в ПААГ. В качестве положительного контроля использовали гис-

тологические препараты амилоидной печени человека.

Иммуноблоттинг проводили с поликлональными антителами к PrP-белкам млекопитающих.

Для электронно-микроскопического анализа сконцентрированные фракции цитомединов и цитаминов наносили на формвар-углеродные подложки (время сорбции 10 мин) и просматривали под электронным микроскопом "JEM-100 S" ("JEOL", $\times 15\,000$ – $100\,000$). Затем подложки с сорбированными препаратами подвергали протеолитической обработке протеиназой K в концентрации 0,2 мг/мл в течение 5, 10 и 20 мин при 37°C, контрастировали и снова просматривали под микроскопом на наличие протеолитически резистентных скрэпи-ассоциированных фибрилл (САФ), в том числе прионов.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В кортексине и ретиналамине нуклеиновые кислоты не обнаружены (рис. 1), что закономерно с учетом метода получения препаратов: стадия ультрафильтрационной очистки на порых волокнах с разрешающей способностью 15 кД гарантирует задержание основной массы нуклеиновых кислот, т.е. частиц размером более 45 нуклеотидов для одноцепочечных молекул и более 23 нуклеотидов для двухцепочечных молекул. Фрагменты ДНК или РНК не более 45 нуклеотидов не обладают матричной или инфекционной активностью [7,8].

Таким образом, представленные экспериментальные данные исключают возможность присутствия в цитомединах и цитаминах жизнеспособных вирусов или функционально активных протоонкогенов.

Окрашивание на общий белок показало, что кортексин и ретиналамин содержат только короткие полипептиды и полиамины с молекулярной массой, не превышающей 10 кД, что значительно меньше молекулярной массы прионов (рис. 2). Таким образом, высокомолекулярного белка, в том числе прионов, в цитомединах с помощью электрофореза не выявлено.

При окрашивании конго красным сконцентрированных фракций цитомединов и цитаминов, фиксированных на ПААГ, не наблюдалось избирательного связывания красителя, в то время как препарат амилоидной печени человека давал яркое избирательное окрашивание конго красным и характерное желто-зеленое свечение амилоидных фибрилл.

Таким образом, с использованием гистохимического метода в пептидных биорегуляторах

не обнаружено амилоидоподобных белковых соединений, в том числе прионов.

В ходе иммуноблоттинга связывания антител с препаратами, выделенными из различных органов и тканей животных, не наблюдалось (рис. 3). Следовательно, нормальный клеточный PrP-белок, безусловно, присутствующий в исходном сырье, эффективно элиминируется в технологическом процессе и в конечном продукте не обнаруживается. Аномальные модификации PrP-белка — прионы — также не выявлены.

Прямое электронно-микроскопическое выявление прионов в виде САФ в сочетании с протеолизом позволяет обнаружить наличие прионов сразу по двум характерным признакам: протеолитической резистентности и морфологическим особенностям фибриллярных структур, образуемых прионами.

Некоторые авторы указывают на то, что агрегация отдельных прионных молекул с образованием жгутообразных структур типа САФ мо-

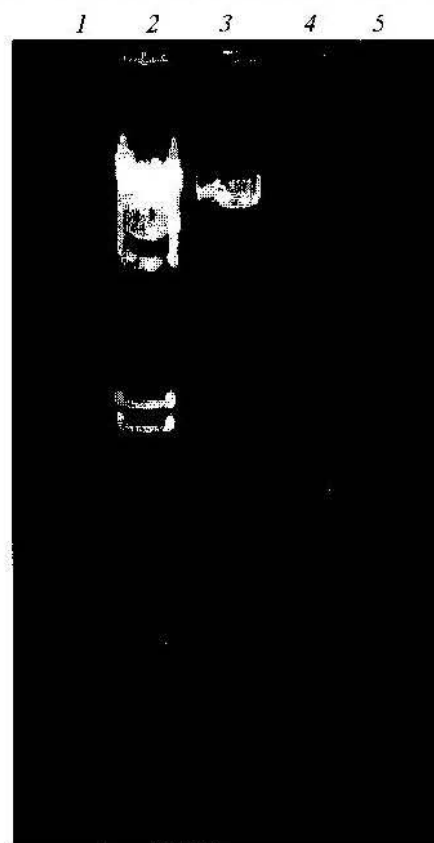


Рис. 1. Электрофорез цитомединов в 1% геле агарозы после фенольно-детергентной экстракции.

1 — отрицательный контроль (0,9% NaCl), 2 — маркер молекулярной массы (ДНК фага лямбда, обработанная эндонуклеазой рестрикции Hind III), 3 — нативная ДНК, выделенная из лимфоцитов крови человека (положительный контроль), 4 — кортексин, 5 — ретиналамин.

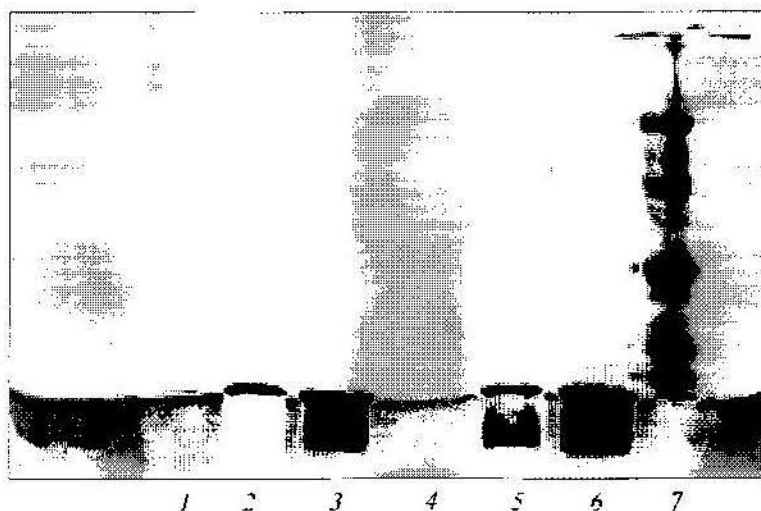


Рис. 2. Электрофорез цитомединов в ПААГ: 1-3 — ретиналамин в концентрациях 1, 5 и 10 мг/мл соответственно, 4-6 — кортексин в концентрациях 1, 5 и 10 мг/мл соответственно, 7 — стандартный раствор маркерных белков.

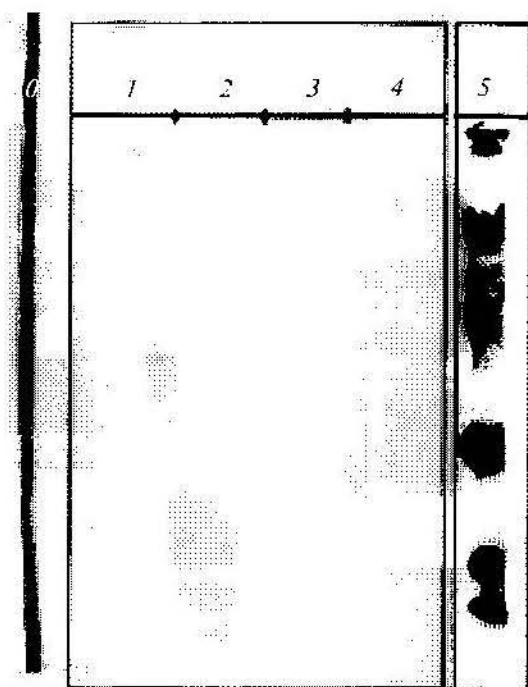


Рис. 3. Анализ цитомединов методом иммуноблотинга с антителами к PrP-белкам.

1, 2 — ретиналамин в концентрации 5 и 10 мг/мл соответственно. 3, 4 — кортексин в концентрации 5 и 10 мг/мл соответственно. 5 — стандартный раствор маркерных белков.

жет происходить уже после обработки протеиназой К в небольшой концентрации, поэтому в отдельных случаях прионы не обнаруживаются электронно-микроскопическим методом до обработки протеиназой.

В наших исследованиях никаких фибриллярных структур, похожих на прионы, в том числе и после протеолиза, выявлено не было.

Таким образом, диагностическими методами, рекомендованными ВОЗ и утвержденными в России, а также в результате углубленного исследования препаратов с использованием иммуноблотинга и электронной микроскопии в цитомединах и цитаминах не выявлено белковых соединений класса амилоидов, в том числе прионов.

Результаты исследований позволяют заключить, что технология получения природных биорегуляторов — цитомединов и цитаминов — гарантирует полное отсутствие в препаратах функционально активных протоонкогенов, жизнеспособных вирусов и других инфекционных агентов, в том числе прионных белков.

ЛИТЕРАТУРА

1. Зуев В.А., Завалишин И.А., Ройхель В.М. Прионные болезни человека и животных. М., 1999.
2. Киселев О.И., Пекрасов П.А., Решетникова О.Ю., Воробьев А.А. // Эпидемиол. и инфекц. болезни. 1998. № 1. С. 4-9.

3. Кузник Б.И., Морозов В.Г., Хавинсон В.Х. Цитомедины: 25-летний опыт экспериментальных и клинических исследований. СПб., 1998.
4. Мазин А.В., Кузнецов К.И., Краев А.С. Методы молекулярной генетики и геной инженерии. Новосибирск, 1990.
5. Морозов В.Г., Рыжак Г.А., Малинин В.В. Цитомедины (биорегуляторы клеточного метаболизма). СПб., 1999.
6. Проблемы здравоохранения, связанные со спонгиозными энцефалопатиями человека и животных: Меморандум совещания ВОЗ // Бюл. ВОЗ. 1992. Т. 70, № 2. С. 24-31.
7. Феннер Ф., Мак-Ослен Б., Мимс С. Биология вирусов животных. М., 1977. Т. 1. С. 75-77.
8. Феннер Ф., Мак-Ослен Б., Мимс С. Биология вирусов животных. М., 1977. Т. 2. С. 293.
9. Prusiner S.B. // Semin. Virol. 1996. Vol. 7. P. 157-167.

Получено 23.07.02
