

РАЗРАБОТКА ОПТИМАЛЬНОЙ ТЕХНОЛОГИИ ЭКСТРАГИРОВАНИЯ РЕГУЛЯТОРНОГО БЕЛКА ГЕПАТОПРОТЕКТОРНОГО ДЕЙСТВИЯ ИЗ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКОГО СЫРЬЯ

И.М.Привалов, Э.Ф. Степанова, В.П. Ямскова

Пятигорская государственная фармацевтическая академия, г. Пятигорск
Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, г. Москва

В работе приводятся комплексные исследования оптимальной технологии экстрагирования регуляторного белка гепатопротекторного действия из биотехнологического сырья. Впервые выявлены и обоснованы оптимальные условия экстракции суммы регуляторных белков из биотехнологического сырья, обладающих гепатопротекторным действием; разработана технология их производства и выбраны характеризующие их качество биологические критерии

Ключевые слова: белок гепатопротекторного действия, биотехнологическое сырье, регуляторные белки.

Создание новых, нативных высокоэффективных биологически активных препаратов для коррекции функций печени является актуальной проблемой биотехнологии и медицины. Перспективный путь создания новых гепатопротекторных препаратов - использование природных веществ, не ксеногенных для организма человека, способных активно влиять на физиологические функции печени, повышать естественную защиту.

В этом аспекте особый интерес вызывают органопрепараты.

Материалы и методы

Институтом биологии развития им. Кольцова РАН из печени лабораторных животных был получен адгезивный белок, исследован на роллерной органной культуре печени тритона. Было выявлено его гепатопротекторное действие [1,3].

Выделенный адгезивный белок, относится к группе новых эндогенных биорегуляторов (регуляторных белков), характеризующихся проявлением биологического действия в сверхмалых дозах (СМД), РБ данной группы стимулируют миграцию и адгезию клеток, влияют на клеточную пролиферацию и дифференцировку, а также апоптоз. Он являлся объектом дальнейшего исследования, с целью разработки на его основе парафармацевтических средств.

Результаты и их обсуждение

В ходе первичных исследований, проведенных ИБР РАН была разработана лабораторная методика получения соответствующих регуляторных белков из печени лабораторных животных. В ходе дальнейшего исследования, необходимо было разработать комплекс биотехнологических решений для получения белков из печени крупного рогатого скота (КРС).

Первым этапом выбора оптимальных условий выполнения технологии следует считать разработку технологии экстрагирования регуляторных белков из печени КРС.

При этом в качестве исходного сырья может быть использована печень КРС, полученная от клинически здоровых животных не старше двух лет. У животных старше этого возраста по заключению ветэкспертизы часто наблюдаются дистрофические изменения печени. Нами были сформулированы технические требования к этому сырью.

Нами экспериментально установлено, что с учетом специфики сырьевого объекта, использовать замороженную печень крайне нежелательно и требуется дополнительная предварительная подготовка органа.

После забоя животного печень помещается в стерильные пакеты с Раствором Рингера, хлоргексидином и антибиотиками (пенициллин + стрептомицин) для исключения микробной контаминации печени, из расчета 100 Ед на 1 мл и помещают в холодильные камеры с температурой от 0 до 3°C.

В качестве оптимального способа экстрагирования нами была выбрана ремацерация, т.к. она наиболее полно учитывает специфику требований к извлечению регуляторных белков и позволяет с наименьшей затратой времени и экстрагента получать обогащенное действующими веществами извлечение.

Для уточнения её условий и выбора количества ступеней нами были выполнены следующие расчёты [2]: Обозначим через единицу количество задержанного в сырье экстракта, пусть общее количество экстракта М таких единиц, тогда согласно оптимально количеству ступеней ремацерации рассчитывается по формуле $n = \frac{-\lg(1-E)}{\lg M}$,

$$n = \frac{-\lg(1-E)}{\lg M} \quad E_n = \frac{M-1}{M^n}$$

, где

Эффективность процесса ремацерации должна быть не менее 90 %.

Эффективность каждой ступени ремацерации при М представлена в таб.1, суммарная эффективность в таб.2.

Таблица 1

Эффективность каждой ступени ремацерации

Эффективность ремацерации Е (каждого слива)						
Исходное сырье (печень КРС(г))	Общее количество экстрагента (мл)	Поглощенный экстрагент (мг)	М	Количество ступеней ремацерации		
				1	2	3
1010	750	86	8,721	0,885	0,102	0,012
995	750	80	9,375	0,893	0,095	0,010
1005	750	85	8,824	0,887	0,100	0,011
1025	750	93	8,065	0,876	0,109	0,013

990	750	90	8,333	0,880	0,106	0,013
1001	750	98	7,653	0,869	0,114	0,015

Таблица 2

Суммарная эффективность ремацерации

Эффективность ремацерации E (суммарная)						
Исходное сырье (печень КРС(г))	Общее количество экстрагента (мл)	Поглощенный экстрагент (мг)	М	Количество ступеней ремацерации		
				1	2	3
1010	750	86	8,721	0,885	0,987	0,998
995	750	80	9,375	0,893	0,989	0,999
1005	750	85	8,824	0,887	0,987	0,999
1025	750	93	8,065	0,876	0,985	0,998
990	750	90	8,333	0,880	0,986	0,998
1001	750	98	7,653	0,869	0,983	0,998

Как следует из таблиц 1 и 2 , требуемая эффективность достигается по истечению второй ступени экстрагирования.

Общее количество экстрагента потраченное на экстракцию сырья составит, примерно 1,5 объема сырья.

Состав экстрагента необходимо было выбрать так, чтобы он был физиологичным и адгезия гепатоцитов при экстракции была минимальной.

С этой целью мы рассмотрели два физиологических раствора, широко применяемых в медицинской практике: физиологический раствор (0,9% NaCl) и раствор Рингера (NaCl, 147 mM, KCl 4 mM, CaCl₂ 2.25 mM), как возможные компоненты экстрагента. Оба раствора приблизительно изотоничны сыворотке млекопитающих. Применяя адгезиометрический метод рассчитываем коэффициент разобшенности при экстрагировании в каждом из растворов, в качестве сравнения берем коэффициент разобшенности соответствующей суспензии гепатоцитов

Данные эксперимента предствлены в таб.3.

Таблица 3.

Зависимость степени разобшенности гепатоцитов

Исследуемая модель	Среднее число живых клеток в поле зрения	Среднее число клеточных ядер в поле зрения	Коэффициент разобшенности
Интактная печень	3 ± 1	10 ± 1	0,2307
Печень, экстрагированная раствором Рингера	10 ± 2	3 ± 1	0,7692

Печень, экстрагированная физиологическим раствором	2 ± 1	10 ± 2	0,1666
Суспензия гепатоцитов	13 ± 1	0 ± 1	~ 1

Из таблицы следует, что в проводимой серии экспериментов, экстрагирование в растворе Рингера обеспечивает наименьшую адгезию гепатоцитов.

Учитывая ионообменные адсорбационные свойства межклеточных компонентов, следует использовать экстракт с ионной силой близкой к физиологической, и с соответствующим значением pH.

Для поддержания постоянного кислотно-щелочного баланса среды в раствор Рингера добавляется буфер HEPES (N-2-Hydroxyethylpiperazone-N-2-Ethanesulfonic Acid).

HEPES имеет оптимальную буферную ёмкость при физиологических значениях pH; и не проникает через мембраны клеток. Для HEPES pH близка к 7,5.

Чтобы довести pH раствора до физиологических значений в раствор вводится гидроксид натрия. Под контролем pH-метра pH раствора корректируется до 8,3.

Как показывают наблюдения, pH раствора остаётся постоянной всё время экстракции.

Оптимальный состав экстрагента следующий: 147 mM NaCl; 4 mM KCl; 2,25 mM CaCl₂; 1mM HEPES.

Выбор температурного режима экстрагирования определялся как спецификой сырья, так и требованием минимальной адгезии клеток. Поэтому для выяснения температурного режима экстрагирования было исследовано экстрагирование в интервале температурот +1°C до 20°C

Результаты опыта представлены в таб 4.

Таблица 4.

Зависимость степени разобщенности гепатоцитов от температуры

Температура процесса	Среднее число живых клеток в поле зрения	Среднее число клеточных ядер в поле зрения	Коэффициент разобщенности
+1°	18 ± 1	2 ± 2	0,9
+2°	18 ± 2	1 ± 1	0,947
+3°	16 ± 2	1 ± 1	0,9411
+7°	12 ± 1	4 ± 1	0,75
+12°	7 ± 2	8 ± 1	0,4666
+16°	3 ± 1	10 ± 2	0,2307
+20°	2 ± 2	11 ± 1	0,1538

Графически зависимость от температуры представлена на рис.1.

Выразим зависимость коэффициента разобшенности от температуры аналитически. Из графического представления исходных данных следует, что корреляционная зависимость может быть либо параболической, либо линейной. Проведя соответствующие преобразования исходных данных, используем ППП MS Excel, для построения корреляционной зависимости. получили формулу. $K_{раз}=1,0170-0,04345*t-0.0009*t^2$. Все вычисленные коэффициенты параболической регрессии статистически значимы. Коэффициент детерминации 0,97 указывает на то что, связь между переменными достаточно тесная и полученную зависимость можно использовать для прогнозирования величины $K_{раз}$ в указанном интервале температур.

Коэффициент разобшенности максимален при температуре +2°. Учитывая нижний предел температур промышленных установок, целесообразно температуру экстрагирования выбирать +3°, +4°.

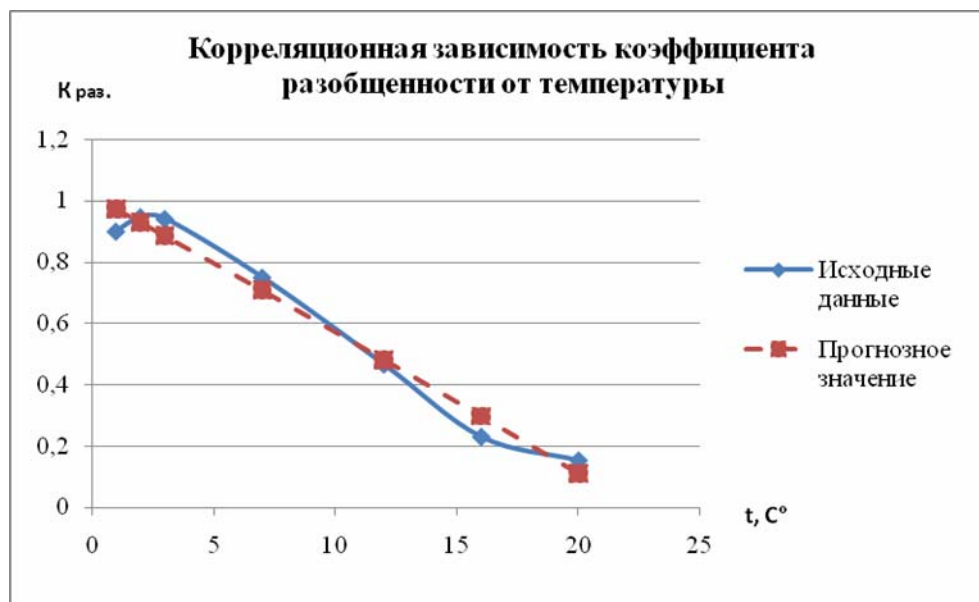


Рис.1 Зависимость коэффициента разобшенности от температуры

Из основного уравнения массопередачи следует, что количество вещества, продиффундировавшего через некоторый слой, прямо пропорционально времени экстракции.

Рассмотрев динамику изменения концентрации белка в ходе экстрагирования, выбираем оптимальное время извлечения.

Данные эксперимента представлены в таб.5.

Таблица 5.

Зависимость общего количества белка от времени экстрагирования

Время экстракции (час)	$E_{пр}$ – экстинкция опытной пробы	Концентрация общего белка в растворе г/л	Концентрация общего белка в экстракте г/л
0,5	0,042	0,42	4,2
1	0,055	0,55	5,5
1,5	0,068	0,68	6,8
2	0,08	0,8	8
2,5	0,082	0,82	8,2
3	0,085	0,85	8,5
3,5	0,086	0,86	8,6
4	0,086	0,86	8,6
4,5	0,086	0,86	8,6

Как следует из представленных данных, максимальная полнота извлечения общего белка достигается при экстрагировании в течение 3,5 часа. Считаем, что этого времени будет достаточно и для извлечения регуляторных белков. Т.о. установлены оптимальные условия экстрагирования:

В качестве:

- способа экстрагирования целесообразно использовать - двухступенчатую ремацерацию.

- способа измельчения – резание: печень режется на куски размером 2-5 мм. с помощью гильотинного механизма с падающим ножом.

Общее количество экстрагента, необходимое для осуществления процесса 1,5 объема сырья.

Состав экстрагента: 147 mM NaCl; 4 mM KCl; 2,25 mM CaCl₂; 1mM HEPES.

В результате впервые выявлены и обоснованы оптимальные условия экстракции суммы регуляторных белков из биотехнологического сырья, обладающих гепатопротекторным действием; разработана технология их производства и выбраны характеризующие их качество биологические критерии.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ямсков И.А. Фармакологические препараты нового поколения на основе ранее неизвестных биорегуляторов-гликопротеинов клеточного микроокружения / И.А. Ямсков, В.П. Ямскова // Рос. хим. журн. (ЖРХО им. Д.И. Менделеева).- 1998.- Т.42, N3.- С. 85-90.
2. Пономарёв В.Д. Экстрагирование лекарственного сырья / В.Д. Пономарёв.- М.: Медицина, 1976.
3. Борисенко А.В. Влияние регуляторного белка, выделенного из печени крыс, на состояние ткани печени тритона *Pleurodeles waltl* при органном культивировании *in vitro* / А.В. Борисенко // Сб. тез. «Биология стволовых клеток: фундаментальные аспекты».- М.,2005.- С. 17-18.

**THE DEVELOPMENT OF THE OPTIMUM EXTRACTION TECHNOLOGY OF THE
REGULATOR ALBUMEN WITH THE GEPATO-PROTECTORS ACTIONS FROM
BIOTECHNOLOGICAL RAW MATERIAL**

I.M.Privalov, E.F.Stepanova, V.P.Jamskova

The complex researches of the optimum extraction technology of the regulator albumen with the gepato-protectors actions from biotechnological raw material are resulted. For the first time the optimum extraction conditions of the regulator albumen from the biotechnological raw material, possessing the gepato-protectors actions are revealed and proved; the technology of their manufacture is developed and biological criteria describing their quality are chosen.