

КИЇВСЬКИЙ НАУКОВО-ДОСЛІДНИЙ ІНСТИТУТ
ГЕМАТОЛОГІЇ ТА ПЕРЕЛИВАННЯ КРОВІ МОЗ УКРАЇНИ

На правах рукопису

ЯКОВЕНКО Світлана Борисівна

***Розробка антипротеїназного засобу на основі
 α_2 -макроглобуліну плазми крові людини та
вивчення деяких механізмів його дії
(експериментальне дослідження)***

14.01.36 - гематологія та переливання крові

А в т о р е ф е р а т
дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата біологічних наук

Київ - 1997

016-27

ДВ36.070

Дисертацією в рукопис.
Робота виконана в Київському
інституті гематології та переливання
МОН України

ЛННБ України ім.В.Стефаніка



00760958 (Z)

НАУКОВІ КЕРІВНИКИ - доктор медичних наук

Пережрестенко Петро Михайлович

доктор медичних наук

Лобунець Константин Антонович

ОФІЦІЙНІ ОПОНЕНТИ - доктор медичних наук

Стариков Анатолій Володимирович

доктор біологічних наук

Алексєєва Ірина Миколаївна

ПРОВІДНА УСТАНОВА - Київська медична академія післядипломної освіти МОН України

Захист дисертації відбудеться "6..."^{14:00}...^{Березня}...1997 р.
о 14:00 годині на засіданні спеціалізованої вченої ради
Д 01.40.01 в Київському НДІ гематології та переливання крові
(254060, м. Київ, вул. М.Берлінського, 12).

З дисертацією можна ознайомитися в бібліотеці Київського науково-дослідного інституту гематології та переливання крові.

Вчений секретар
спеціалізованої вченої ради

Косиць

КОМІСАРЕНКО В.Г.

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність проблеми. Перспективність розробок по вирішенню складної проблеми раціонального використання плазми крові людини зумовлюється потребами клінічної медицини в розширенні номенклатури аlogenних білкових препаратів з різноманітною терапевтичною дією. В останні роки сформувався новий напрямок комплексної безвідходної переробки плазми, спрямований на одержання із цієї унікальної сировини принципово нових трансфузійних препаратів антиферментної, імунологічної дії /В.А.Алешкин, 1992, А.Г.Люттов, 1994 /.

Особливий інтерес дослідників привертає полівалентний інгібітор протеолітичних ферментів α_2 -макрोगлобулін (α_2 -М), здатний регулювати процеси протеолізу в організмі в умовах його надмірної активації /W.Borth, 1992/. Він характеризується високою антипротеїназною ємністю та інактивує майже всі відомі протеїнази, в тому числі неспецифічні в широким спектром дії /С.В.Русаков, А.В.Кубышкин, 1995, А. G.Barret, G.Salvesen, 1986, R.S.Roberts, 1985/. В умовах патології ці ферменти накопичуються у великій кількості і викликають деструктивні процеси в організмі хворих / Т.А.Велова, Г.В.Привалов, Г.Е.Важанова, 1991, К.Н.Веремеенко, О.П.Голобородько, А.И.Кизим, 1988, В.В.Саломатин, А.Г.Люттов, С.А.Еникеева и др., 1993/. Відомо, що α_2 -М створює захисний бар'єр проти різних інфекційних збудників завдяки зниженню активності більшості мікробних протеїназ і інгібіції розмноження вірусів /И.Бумблите, 1992, S.Myoshi, S.Shin-ichi, S.Sumio, 1991/. Однією з його важливих функцій є елімінація активованих ферментів протеолізу із кровотоку /А.С.Кутманова, Р.М.Боголюбова, Т.В.Антонова, 1992/. α_2 -М має також важливе значення в

Люттов В. С. Формирование
АН Украины

підтримці гемостатичного балансу в організмі шляхом регуляції протеолітичних систем крові, які відповідають за процеси коагуляції, фібрinolізу, кініногенезу /Н.А.Зорин, Р.М.Зорина, В.С.Горин и др., 1993, В.Bennet, 1990/. Цей інгібітор контролює протеазозалежні реакції в модулюванні імунної відповіді, виступаючи в ролі універсального регулятора імунної системи /М.А.Пальцев, А.А.Иванов, 1995, R.E.Banks, S.W.Evans, 1991, K.James, 1990, E.Van Leuven, 1990/.

Унікальні властивості α_2 -М і його значимість у розвитку патологічних процесів обумовили доцільність розробки промислового способу одержання багатодільового аlogenного лікувального засобу на його основі.

Мета роботи. Розробити на основі полівалентного інгібітора плазми крові людини α_2 -М антипротеїназний засіб, вивчити в експерименті його терапевтичну ефективність та деякі механізми дії.

Завдання дослідження :

1. Вивчити ефективність природних плазмених протеїнів для стабілізації концентрату α_2 -М та розробити спосіб одержання антипротеїназного засобу на його основі.

2. Провести комплексну оцінку фізико-хімічних властивостей антипротеїназного засобу при різних строках зберігання.

3. Визначити антикомплементарну активність антипротеїназного засобу в дослідях *in vitro* та *in vivo*.

4. Оцінити токсичність та нешкідливість антипротеїназного засобу для організму.

5. На експериментальній моделі опікової хвороби визначити можливість корекції порушень системи протеолізу в організмі з допомогою розробленого антипротеїназного засобу та дослідити деякі механізми його дії.

Новизна досліджень. Вперше на основі полівалентного інгібітора протеїназ α_2 -М, який був виділений з відходів промислової переробки плазми крові людини, розроблено антипротеїназний засіб з застосуванням для його стабілізації природних плазмених протеїнів. Цей засіб придатний для внутрішньовенного введення /патент N 9703 А /.

Показана терапевтична ефективність нового антипротеїназного засобу на експериментальній моделі опікової хвороби.

Доведено, що механізм реалізації біологічного ефекту розробленого антипротеїназного засобу пов'язаний із здатністю молекули α_2 -М в умовах активації системи протеолізу стабілізувати клітинні мембрани та зв'язувати надлишок лісосомальних ферментів і швидко виводити їх із циркуляторного русла.

Теоретичне і практичне значення роботи. Отримані в роботі наукові результати поглиблюють теоретичні уявлення про механізм патогенетичної дії α_2 -М в організмі та роль його при опіковій хворобі.

Технологія одержання антипротеїназного засобу із вторинної сировини є практичним внеском в вирішення загальної проблеми комплексної безвідходної переробки донорської крові. Результати роботи використані при розробці проектів НТД на серійне виготовлення антипротеїназного препарату, умовно

названого "Альфамінал".

Розроблено на основі полівалентного інгібітора протеолітичних ферментів α_2 -М новий аlogenний трансфузійний засіб для еназимотерапії станів з вираженою активацією системи протеолізу в організмі. Цей засіб може використовуватись там, де нині широко застосовуються фармакологічні препарати (трасилол, контрикал, гордокс та інш.) виключно ксеногенної природи.

Положення, які вносяться на захист :

1. Можливість одержання в єдиному циклі промислової переробки донорської крові нового антипротеїназного засобу на основі полівалентного інгібітора протеолітичних ферментів α_2 -М з застосуванням для його стабілізації природних плазмених протеїнів

2. Розроблений антипротеїназний засіб характеризується стабільністю фізико-хімічних та специфічних властивостей, нешкідливий для організму та відповідає вимогам до препаратів для внутрішньовенного введення.

3. Новий антипротеїназний засіб поєднує біологічні ефекти α_2 -М та альбуміну, що обумовлює його високу терапевтичну дію при термічних опіках.

Апробація роботи. Основні положення дисертації викладені на III Всесоюзному з'їзді гематологів та трансфузіологів (Кіров, 1991), IV Всесоюзній конференції по кровозамінникам (Москва, 1991), IV Всесоюзній конференції "Интенсивное лечение тяжело обожженных" (Москва, 1992), III Міжнародному симпозіумі "Системно-антисистемная регуляция в живой и неживой природе" (Київ, 1993), XIV з'їзді фізіологів України (Київ, 1994), Російській конференції "Актуальные вопросы службы

крови и трансфузиологии" (Санкт-Петербург,1995), III з'їзді гематологів та трансфузіологів України (Суми, 1995), Міжнародній конференції "Актуальні питання морфології" (Тернопіль,1996), II конгресі патофізіологів України (Київ,1996).

На основі матеріалів дисертації опубліковано 15 наукових робіт, отримано патент N 9703 А .

Структура та об'єм дисертації. Тема дисертації затверджена на засіданні Вченої ради Київського НДІ гематології та переливання крові , протокол N 9 від 19.11.1992 р., і є фрагментом теми МОЗ України "Створення на основі α_2 -М плазми донорської крові препарату антипротеїназної дії" (N держреєстрації 0189002274, шифр ВН. 28.00001689).

Дисертація викладена на 150 сторінках машинопису. Складається із вступу, огляду літератури, 4 глав власних досліджень, обговорення результатів, висновків. Список літератури включає 180 джерел. Робота ілюстрована 18 таблицями і 12 малюнками.

Декларація особистого внеску у розробку наукових результатів. Особистий внесок дисертанта полягає в аналізі актуальності роботи, розробці технології одержання препарату, виборі методик та проведенні лабораторних та експериментальних досліджень , аналізі та узагальненні одержаних результатів, формулюванні висновків та положень роботи, що виноситься на захист. Робота виконана в лабораторії фракціонування плазми крові КНДІГПК (зав.-д.м.н. А.С.Тимченко). Моделювання опікової хвороби проведено спільно з співробітниками опікового відділення (зав.- професор М.Ю.Повстаний). Вивчення ефективності засто-

сування антипротеїназного засобу при термічній травмі проведено спільно в к.б.н. В.М.Лосицькою, к.б.н. М.Ю.Аношиною, н.с.В.А.Мащенко (КНДІГПК).

МАТЕРІАЛ І МЕТОДИ

Для одержання антипротеїназного засобу на основі α_2 -М була використана фракція III білків плазми (по Кону). Це зумовлено тим, що в ній вміст інгібітора складає близько 50 % від його загальної концентрації в плазмі /М.Воппеау, М.Лауру, 1983/. Для проведення комплексу досліджень в промислових та лабораторних умовах було воготовлено 27,6 кг осаду фракції III модифікованим методом Кона /К.А.Лобунец, И.Н.Фатеєва, Н.И.Ларичева, 1989/. З неї методом етанолово-риванолового фракціонування /К.А.Лобунец, Н.Т.Терехов, О.С.Семенюта и др., 1981/ виділено 5,6 кг осаду концентрату α_2 -М. Підібрано оптимальний режим сублимаційного висушування концентрату для одержання його сухої форми. На основі концентрату α_2 -М в застосуванням природних плазмених білків-стабілізаторів розроблена стабілізована композиція; а саме: 6 серій із стабілізатором трансферином та 10 серій - із альбуміном.

Використані в роботі реактиви, реагенти, матеріали та обладнання відповідали чинним вимогам до виробництва препаратів крові.

Вивчення показників якості препарату провадили відповідно вимогам Державної фармакопеї та діючих фармакопейних статей на препарати, призначені для внутрішньовенного введення. При цьому вивчали: фізико-хімічні показники (прозорість, кольоровість, відносну в'язкість, водневий показник рН, масову концентрацію білку, електрофоретичний склад, в су-

кому препараті- втрату маси при висушуванні /ГФ 11 изд., Вып.2, 1990, Приказ N 31,1983/; вміст α_2 -М по трипсинів'язуючій активності /К.Н.Веремеенко О.П.Голобородько, А.И.Кивим, 1988/; концентрацію ліпідів та ліпідних фракцій /R.E.Bowman,1962, Ю.М.Островский,1961/. Біологічний іспит розробленого антипротеїназного засобу (пірогенність, токсичність, нешкідливість) проводили на 3 видах лабораторних тварин : 75 кроликах породи шиншилла, 125 неділіїних білих мишах, 50 гвінейських свинках / ГФ 11 изд., Вып.2, 1990/. Антикплементарну активність визначали в реакції зв'язування комплементу по уніфікованому методу визначення гемолітичної активності комплементу по п'ятидесятипроцентному гемолізу еритроцитів барана /В.В.Меньшиков, 1987, ФС 42-322 ВС-88, 1989/.

Терапевтична дія антипротеїназного засобу була вивчена на експериментальній моделі опікової хвороби.

На 153 гвінейських свинках проведено 4 серії дослідів : I-контрольна; II- експериментальна опікова хвороба; III-експериментальна опікова хвороба з наступним застосуванням антипротеїназного засобу для лікування (доза 30 мг/100 г маси на протязі 4 діб); IV - багаторазове введення антипротеїназного засобу з метою вивчення нешкідливості його для організму (доза 30 мг/100 г маси на протязі 4, 10 діб).

Для характеристики загального стану тварин вивчали гемограми, мієлограми, показники функціональної активності печінки за уніфікованими методами, /В.В.Меньшиков, 1987/; система протеолізу характеризувалась за активністю кислих протеїназ та концентрацією інгібіторів протеолітичних ферментів сироватки крові /К.Н.Веремеенко,О.П.Голобородько,А.И.Кивим, 1988/.

вим, 1988/. Функціональними критеріями запального процесу при експериментальній опіковій хворобі були показники активності кислих протеїнів /К.Н.Веремеєнко, А.И.Цыганов, В.А.Гукович и др., 1980/ та антитриптична активність сироватки крові і вміст в ній α_2 -М / К.Н.Веремеєнко, О.П.Голобородько, А.И.Кивим, 1988/. Вплив антипротеїназного засобу на проникність клітинних мембран досліджували за ступенем резистентності лізосомальних структур лімфоцитів /Е.Д.Молюк, 1981/.

Результати проведених досліджень оброблені методом варіаційної статистики / Г.Ф.Лакин, 1980/.

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Для виділення із фракції Ш білків α_2 -М був використаний розроблений в КНДІГПК етанолово-риваноловий метод одержання концентрату α_2 -М /К.А.Лобунец, Н.Т.Терехов, О.С.Семенюта и др., 1981/.

Інгібітор α_2 -М є високореакційним лабільним білком, надзвичайно чутливим до різноманітних фізичних та хімічних агентів, тому після одержання сирого осаду концентрату α_2 -М нами був відпрацьований м'який режим сублимаційного висушування, який забезпечував найменший вплив температурного фактора на конформацію та функціональну активність молекули інгібітора. Температура нагрівання продукту під час сублимації не перевищувала величину 10 °С, а тривалість процесу досягала 38 годин. Методом сублимаційного висушування одержано 0,6 кг сухого концентрату α_2 -М. Концентрат мав вигляд дрібнодисперсного порошку білого кольору. Втрата маси при висушуванні складала (1,7±0,2) %, що свідчило про можливість його тривалого зберігання. Вихід сухого порошку із 1 кг сирого

осаду фракції III складав (30,3±4,3) г, питомий вміст α_2 -М в ньому становив від 43 до 60 %, це вказувало на понад 10-кратне збагачення концентрату біологічно активним інгібітором в порівнянні з нативною плазмою.

Як відомо, /Т.А.Белова, 1981, О.С.Семенюта, 1983 /, розчини концентрату α_2 -М нестабільні, тому при зберіганні спостерігається значне зниження їх інгібіторних властивостей. Нами були розроблені стабілізуючі білково-сольові розчини, які містили природні плазмові стабілізатори альбумін та трансферин. Дослідження фізико-хімічних та ензиматичних властивостей дозволило оцінити в порівняльному аспекті обидві форми стабілізованої композиції концентрату α_2 -М та встановити умови і строки зберігання без втрати специфічної активності.

В результаті дослідження 6 одержаних серій концентрату α_2 -М із стабілізатором трансферином були встановлені значимі відмінності фізико-хімічних показників розчинів при зберіганні. Це відображалось у зниженні на 42 % активності α_2 -М і свідчило про часткове руйнування білкових молекул .

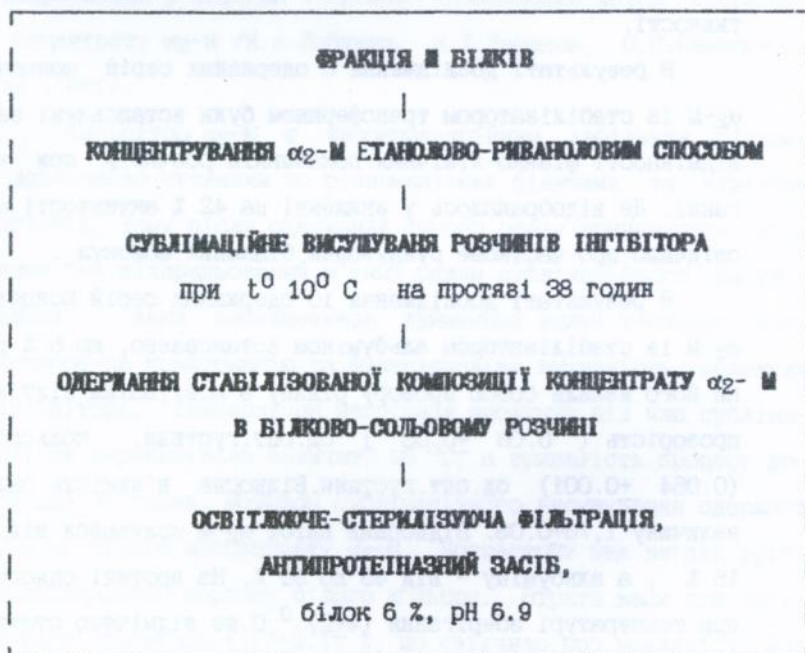
В результаті дослідження 10 одержаних серій концентрату α_2 -М із стабілізатором альбуміном встановлено, що 6 % розчини його являли собою прозору рідину в жовтуватим відтінком : прозорість (0.08 ±0.03) од.опт.густини, кольоровість (0.064 ±0.001) од.опт.густини. Відносна в'язкість складала величину 1,78±0.03. Відносний вміст α_2 -М коливався від 12 до 15 % , а альбуміну - від 45 до 50 %. На протязі одного року при температурі зберігання (4±2) °С не відмічено статистично достовірних змін по цим показникам , що вказувало на здатність розробленого білково-сольового розчину на основі

альбуміну стабілізувати високореактивний білок α_2 -М, запобігаючи його агрегації.

При етаноловому фракціонуванні в фракцію III осаджується основна маса ліпоїдних речовин плазми крові, тому проводили їх кількісне визначення в стабілізованій композиції концентрату α_2 -М. Було виявлено, що в препараті концентрація ліпідів в 4 рази, холестерину в 3 рази, тригліцеридів в 1.5 рази була меншою цих величин в сироватці крові. Ці дані свідчили про суттєве очищення розробленого засобу.

Технологічний процес концентрування α_2 -М та одержання його стабільних розчинів в функціонально повноцінному стані відображено на мал.1.

СХЕМА ОДЕРЖАННЯ АНТИПРОТЕІНАЗНОГО ЗАСОБУ НА ОСНОВІ α_2 -М



Для характеристики лікувального препарату обов'язковим є визначення його нешкідливості для організму. При дослідженні біологічних властивостей антипротеїназного засобу було встановлено, що внутрішньовенне введення препарату кролям в тест-дові 3 мл/кг маси, мишам - 0,5 мл, гвінейським свинкам - 5 мл (підшкірно) не викликало ні загальних, ні місцевих реакцій, що дозволило вважати його апірогенним та не токсичним.

Антикомплементарну активність антипротеїназного засобу визначали в дослідках *in vitro* та *in vivo*. В дослідках *in vitro* виявлено, що при спільній інкубації в гемолітичній системі розчинів, які містили 2 CH₅₀ одиниці комплементу та 10 мг білку антипротеїназного засобу, не змінюється гемолітична активність комплементу. Ступінь гемолізу сенсibiliзованих еритроцитів барана складав від 89 до 90%. Ці дані не відрізнялись більш, ніж на 5% від показників контролю, які становили від 90 до 91%. Одержані результати свідчили про те, що антипротеїназний засіб відповідає вимогам діючої НТД (ФС 42-322 ВС-88, 1989) на препарати плазми крові, придатні для внутрішньовенного введення.

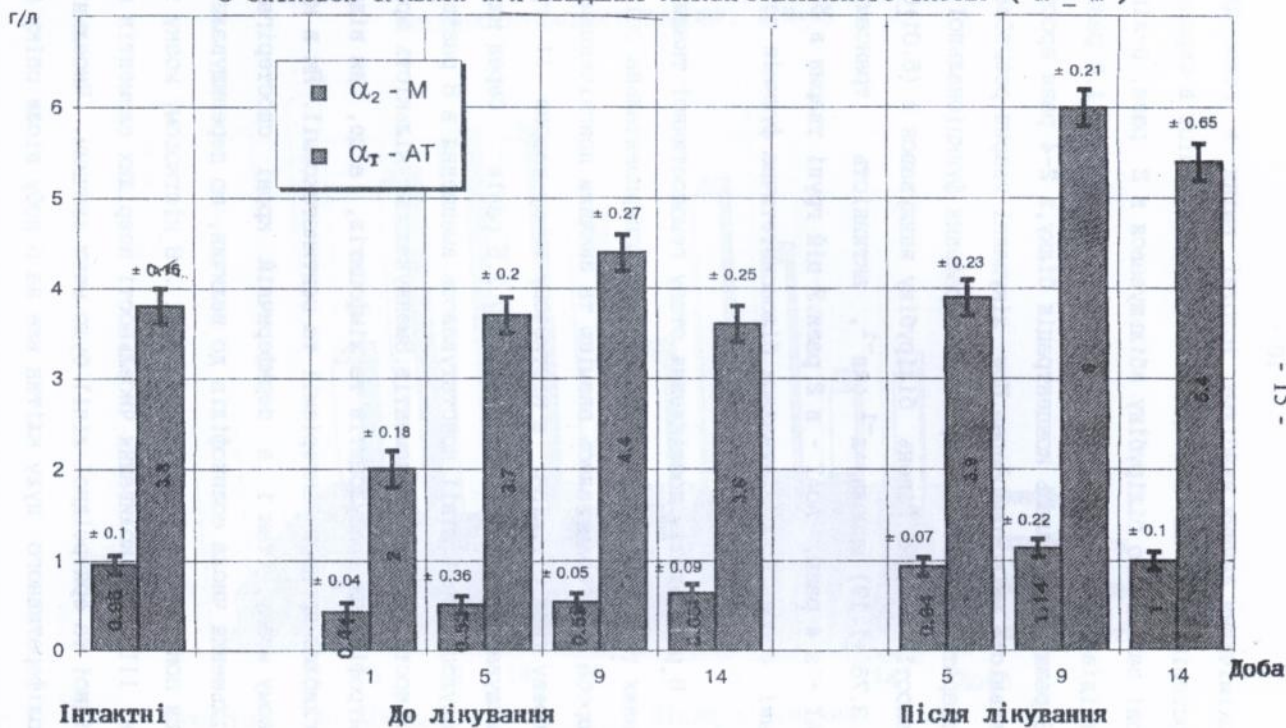
Внутрішньовенні інфузії антипротеїназного засобу в тест-дові 5 мл/кг маси також не супроводжувались суттєвим зниженням загальної гемолітичної активності сироватки крові тварин. Коефіцієнт антикомплементарності не перевищував 1.08 при веденні препарату різних строків зберігання, що свідчило про відсутність в ньому комплементів'язуючих властивостей.

Терапевтична ефективність розробленого антипротеїназного засобу досліджувалась в експерименті на моделі опікової хвороби. Такий вибір був зумовлений тим, що в патогенезі да-

ної хвороби важливу роль відіграє активація ферментних систем протеолізу, яка призводить до накопичення токсичних продуктів білкової деградації у кров'яному руслі і сприяє формуванню опікової токсемії. Результати дослідів свідчили, що термічна травма викликала значні пошкодження білкових структур і вихід протеолітичних ферментів в кров. Активність лізосомальних ферментів зростала в середньому в 6 разів у порівнянні з показниками інтактних тварин. Посилення процесів протеолізу супроводжувалось одночасним зниженням інгібіторного потенціалу в середньому в 2 рази, яке вказувало на те, що власна антипротеїназна система не повністю справляється з регуляцією протеолізу. Введення розробленого антипротеїназного засобу сприяло нормалізації клінічного стану тварин і біохімічних показників вже на 5 добу після опіку, у групі свинок без введення такі показники були лише на 14 добу. При цьому рівень активності кислих протеїназ знижувався в $(11,3 \pm 0,9 \text{ до } 4,7 \pm 0,9) \text{ мкмоль} \cdot \text{д}^{-1} \cdot \text{хв}^{-1}$ і не перевищував на 5 добу величини фізіологічної норми. Встановлено також стійке зростання в 1,5-2 рази концентрації плазмових інгібіторів α_1 -антитрипсину та α_2 -М, що значно підвищувало регуляторну здібність організму в умовах гіперактивації системи протеолізу. Зростання інгібіторного потенціалу в плазмі крові обпечених тварин при введенні антипротеїназного засобу відображено на мал.2.

Встановлено позитивний вплив антипротеїназного засобу на функцію печінки, від функціональної активності гепатоцитів якої, як відомо, в значній мірі залежить рівень інтоксикації при опіковій хворобі. Термічна травма призводить до активації гідролітичних ферментів у печінці. За одержаними

ПІДВИЩЕННЯ ІНГІВІТОРНОГО ПОТЕНЦІАЛУ В СИРОВАТЦІ КРОВІ ГВІНЕЙСЬКИХ СВИНОК
 З ОПІКОВОЮ ТРАВМОЮ ПРИ ВВЕДЕННІ АНТИПРОТЕІНАЗНОГО ЗАСОБУ ($M \pm m$)

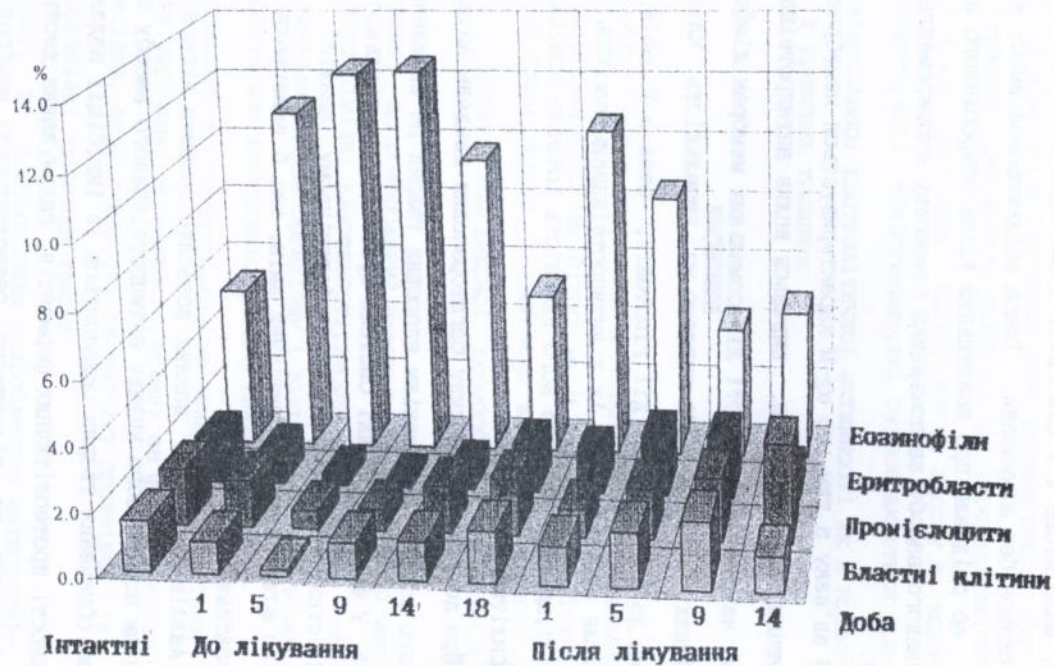


Мал. 2

біохімічними даними найбільш істотні зміни в гепатоцитах спостерігались на 1-5 добу після опіку. Вміст в сироватці крові загального білірубину збільшувався в 2 рази, β-ліпопротеїдів - в 1,6 рази, рівень тимолової проби - в 1,8 рази, в 1,3 рази зменшувалась концентрація білку, в 2-4 рази зростала активність амінотрансфераз. При лікуванні тварин розробленим препаратом відмічалось суттєве покращення функціональної активності печінки. Рівень білірубину знижувався з $(6.01 \pm 0.62$ до $3.76 \pm 1.19)$ $\mu\text{моль} \cdot \text{л}^{-1} \cdot \text{хв}^{-1}$, активність трансаміназ АЛАТ - в 4 рази, АСАТ - в 2 рази. У цій групі тварин в більш ранні строки нормалізувалась білоксинтетична функція печінки.

В результаті дослідження стану гемопоетичної тканини у різних групах тварин встановлено, що експериментальна опікова хвороба супроводжувалась анемією та значним пригніченням гемопоезу (мал.3). Так, в кістковому мозку тварин II групи зменшувався вміст еритробластів у 7.5 разів. Серед клітин гранулоцитарної лінії констатувалось зменшення в 8 разів чисельності молодих елементів. Зменшувалась кількість зрілих нейтрофільних гранулоцитів та лімфоцитів, а це, як відомо, поглиблює процеси бактеріємії та септикотоксемії. Як в кістковому мозку, так і в периферичній крові спостерігалось збільшення числа еозинофілів до величин, що перевищували в 2 рази показники у контрольній групі. В кістковому мозку тварин III групи коливання чисельності незрілих елементів мієлоїдної та еритроїдної лінії було менш значним. Чисельність проліферативного пулу клітин вже на 5 добу після опіку була у 6 разів вищою, ніж у тварин без лікування і близькою до показників інтактних гвінейських свинків. Зростання числа ео-

**ЗМІНИ КЛІТИННОГО СКЛАДУ КІСТКОВОГО МОЗКУ ГВІНЕЙСЬКИХ СВИНОК
ПІСЛЯ ОПІКОВОЇ ТРАВМИ І НАСТУПНОГО ВВЕДЕННЯ
АНТИПРОТЕІНАЗНОГО ЗАСОБУ, (M+m)**



Мал. 3

винофілів в 1.6 разів ,яке,як відомо, обумовлюється інтоксикацією, мало місце і у цій групі , але було вірогідно нижчим ніж у свинок без лікування. Також збільшувався вміст лімфоцитів, що свідчило про позитивний вплив розробленого антипротеїназного засобу на показники гемопоєзу експериментальних тварин.

В зв'язку з тим, що α_2 -М характеризується мембраностабілізуючими властивостями, вивчався вплив антипротеїназного засобу на стан проникності лізосомальних мембран лімфоцитів лімфоїдних органів. Встановлено, що чисельність клітин , стійких до пошкоджуючої дії гіпотонії, стає в 9 разів більшою після культивування їх з антипротеїназним засобом, ніж в контролі, що свідчить про його здатність істотно стабілізувати субклітинні мембрани.

При дослідженні впливу багаторазових введень антипротеїназного засобу на організм здорових тварин не виявлено порушень у функціонуванні системи протеолізу , діяльності печінки, стану гемопоєзу. При морфологічному аналізі також не було встановлено специфічних змін, які б вказували на його негативну дію.

Аналіз отриманих даних дозволяє зробити висновок, що механізм позитивного впливу антипротеїназного засобу на організм обпечених тварин складається із інгібіції надлишкової активності протеолітичних ферментів, гальмування деструктивних процесів та підвищення резистентності мембран клітин життєвоважливих органів до рівнобічної пошкоджуючої дії опіку.

Таким чином, на основі полівалентного інгібітора протеїназ α_2 -М розроблено антипротеїназний засіб , який характе-

ризується стабільністю фізико-хімічних та специфічних властивостей, нешкідливий для організму. На експериментальній моделі опікової хвороби встановлена його терапевтична ефективність. Отримані результати свідчать про перспективність використання нового аlogenного інгібіторного засобу в комплексній ензимотерапії захворювань, які супроводжуються розвитком небалансованої протеолітичної активності як в кровотоці, так і в уражених тканинах.

ВИСНОВКИ

1. Розроблено метод одержання антипротеїназного засобу на основі полівалентного інгібітора α_2 -М та білків-стабілізаторів плазми крові людини, який може входити до єдиного технологічного процесу комплексної переробки крові (патент N 9703).

2. Доведено, що розроблений антипротеїназний засіб має стабільні фізико-хімічні властивості, високу специфічну активність, нешкідливий для організму і відповідає всім вимогам до препаратів для внутрішньовенного введення.

3. Встановлено, що багаторазове введення антипротеїназного засобу не спричиняє негативного впливу на функціональну активність печінки, стан гемопоєзу та систему протеїназ-інгібіторів в організмі здорових тварин.

4. Виявлено, що застосування розробленого антипротеїназного засобу при експериментальній опіковій хворобі викликає зниження рівня активності протеїназ сироватки крові в 6 разів, підвищення антипротеїназного потенціалу в 2 рази, що перешкоджає розвитку протеолізу в організмі.

5. Визначено, що використання антипротеїназного засобу при опіковій патології запобігає токсичній дії продуктів активованого протеолізу на життєдіяльність печінки та стан гемопоезу експериментальних тварин.

6. Доведено, що механізм патогенетичної дії розробленого антипротеїназного засобу в умовах гіперактивації систем протеолізу обумовлений поєднанням біологічних ефектів α_2 - та альбуміну, які здатні у комплексі нейтралізувати та швидко виводити надлишок протеолітичних ферментів із організму.

СПИСОК РОБІТ, ОПУБЛІКОВАНИХ ПО ТЕМІ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Физико-химические и антикомплементарные свойства концентрата α_2 -макроглобулина для внутривенного введения // Врач. дело. - 1993. - N 2-3. - С. 76-78 / соавторы П.М.Перехрестенко, К.А.Лобунец, М.С.Волошина и др./

2. Эффективность применения стабилизированной композиции концентрата α_2 -макроглобулина при ожоговой болезни в эксперименте // Клин. хирургия. - 1992. - N 3. - С. 30-32 /соавторы П.М.Перехрестенко, В.М.Лосицкая, М.С.Волошина и др./

3. Влияние ингибитора протеиназ α_2 -макроглобулина на морфогистохимические изменения при экспериментальной ожоговой болезни // Архив клин. и эксперимент. медицины. - 1995. -- Т. 4, N 1. - С.14-18 / соавторы П.М.Перехрестенко, А.С.Тимченко, М.С.Волошина и др. /

4. Физико-химические свойства и безвредность для организма концентрата α_2 -макроглобулина для внутривенного введения / Гематол. и трансфузиол.: Респ. межвед. сб. - Киев :

Здоровья, 1992. - Вып. 27. - С. 36-39 / соавторы К.А.Лобунец, М.С.Волошина, А.П.Зайченко и др. /

5. Антикомплементарная активность концентрата α_2 -макроглобулина и состояние периферической крови экспериментальных животных после его применения // Гематол.и трансфузиол.: Респ.межвед.сб.- Киев :Здоровья, 1993. - Вып.28. - С. 99-102 / соавторы П.М.Перехрестенко, К.А.Лобунец, М.С.Волошина, и др. /

6.Корекція гематологічних показників при опіковій хворобі антипротеїназним засобом на основі α_2 -макроглобуліну //Фізіологічний ж. - 1996. - Т.42, N 3-4. - С. 95 /співавтори А.С.Тимченко, П.М.Перехрестенко/.

7. Изучение комплекса плазменных белков донорской крови как возможной основы для создания лекарственной формы препарата антипротеиназного действия // Мат. III Всесоюз. съезд гематол. и трансфузиол. - Киров : Б.и., 1991. - С. 85-86 / соавторы К.А. Лобунец, М.С.Волошина, О.С.Борисевич и др. /

8. Концентрат α_2 -макроглобулина для внутривенного введения // Мат. IV Всесоюз. науч.-тех. конференции " Актуальные проблемы улучшения качества кровезаменителей , консервантов крови,гормональных и органотерапевтических препаратов". - М. : Б.и., 1991. - С. 144 /соавторы К.А.Лобунец, М.С.Волошина, А.П.Зайченко и др. /

9. Роль плазмового інгібітора протеїназ α_2 -макроглобуліну в регуляції гемостазу // Тез.доп.14 в'їзду українського фізіолог.товариства. - Київ : Б.в., 1994. -С.200-201 /співавтори П.М.Перехрестенко, А.С.Тимченко, М.С.Волошина та інш. /

10. Вплив багаторазових введень концентрату α_2 -макроглобуліна на гематологічні показники і активність трансаміназ

сироватки крові гвінейських свинюк // Зб. наук. праць, присв. 75-річному ювілею КДІВЛ. - Київ. - 1993. - С. 131-132 /спів-автори П.М.Перехрестенко, К.А.Лобунець, М.С.Волошина та інш./

11. Влияние концентрата α_2 - макроглобулина на течение ожоговой токсемии в эксперименте // Тев. докл. Международ. конф. "Интенсивное лечение тяжело обожженных ". - М : Б.и., 1992. - С. 111-112 / соавторы П.М.Перехрестенко, К.А.Лобунец, М.С.Волошинв и др./

12. Эффективность применения препарата плазменного ингибитора в регуляции гемопозва и детоксикации организма при экспериментальной ожоговой болезни // Тев. докл. Российской конф. " Актуальные вопросы службы крови и трансфузиологии". - С.-Петербург, 1995. - С. 285-286 / соавторы П.М.Перехрестенко, М.В.Аношина /

13. Патогенетическое значение препарата антипротеиназного действия в регуляции функции печени и детоксикации организма // Тев. докл. III Украинского съезда гематол. и трансфузиол., г. Сумы. - Киев : Б.и. - 1995. - С. 154-155 /соавторы А.С.Тимченко, М.Ю.Аношина, М.С.Волошина /

14. Препарат антипротеиназного действия на основе α_2 -макроглобулина и его влияние на активность протеолитических ферментов сыворотки крови и неспецифическую резистентность организма / Тев. докл. III Украинского съезда гематол. и трансфузиол., г. Сумы. - Киев : Б.и. - 1995. - С. 153 / соавторы П.М.Перехрестенко, А.С.Тимченко, М.С.Волошина и др. /

15. До механізму дії антипротеїназного засобу на основі α_2 -макроглобуліну при термічних опіках / Mat .Міжнарод.конф. "Актуальні питання морфології".-Тернопіль :В.в.,1996.-С.680-

/співавтори А.С.Тимченко, П.М.Перехрестенко, В.А.Мащенко/

16. Патент 9703 А Україна, МПК^Б А 61 К 37/04, А 61 К 37/64 Антипротеїназний засіб / співавтори П.М.Перехрестенко, А.С.Тимченко, К.А.Лобунець. - N94127967; Заяв.12.12.94.

А Н О Т А Ц І Я

Яковенко С.Б. Розробка антипротеїназного средства на основе α_2 -макроглобулина плазми крови и изучение некоторых механизмов его действия.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 14.01.36 - гематология и переливание крови, Киевский НИИ гематологии и переливания крови, Киев, 1997.

Защищается рукопись, которая содержит исследования по разработке и экспериментальному изучению нового антипротеиназного средства на основе поливалентного ингибитора плазмы крови человека α_2 -макроглобулина. Проведена оценка качества и определена терапевтическая эффективность его на экспериментальной модели ожоговой болезни.

Установлено, что механизм патогенетического действия антипротеиназного средства обусловлен способностью корректировать нарушения протеиназо-ингибиторного баланса в организме. Нейтрализация и быстрая элиминация широкого спектра лизосомальных ферментов уменьшает токсическое влияние продуктов ожогового протеолиза на функциональное состояние жизненно важных клеток и органов.

Разработанный способ получения антипротеиназного средства защищен патентом Украины N 9703 А.

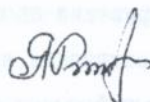
Yakovenko S.B. Elaboration of Antiproteinase Remedy on the Basis of α_2 -Macroglobulin from Blood Plasma and Studies of Some of its Effectivity Mechanisms .

Thesis for a master's degree in biology in speciality 14.01.36 - haematology and blood transfusion, Kyiv Research Institute of Haematology and Blood Transfusion, Kyiv, 1997.

The manuscript is devoted to elaboration and experimental studies of new antiproteinase remedy on the basis of proteinase inhibitor α_2 -macroglobulin obtained from donors plasma. The estimation of the product quality and the evaluation of its curing efficiency on the model of experimental burn disease were carried out. It is found out that the product pathogenetic mechanism is stipulated by its ability to correct proteinase-inhibitor balance disorders in organism. The preparation decreases burn proteolysis toxic effect on the functional status of important cells and organs due to its ability to neutralize and eliminate a large spectrum of lysosomal enzymes.

The worked out method is depended by Ukrainian Patent N 9703 A.

Ключові слова : α_2 -макроглобулін, антипротеїназний засіб, опікова хвороба, протеоліз.



Підписано до друку 14.01.97р. Формат 60x84/16.
Ум. друк. арк. 1,0. Обл.-вид. арк. 1,0.
Тираж 100. Зам. 12.

Відділ оперативної поліграфії
Центру Міжнародної освіти
227-12-75, 227-37-86

492295

AB 36.815