

© И.Б. Шукуров, В.И. Шукурова, С.И. Шукурова, С.Ф. Сулейманов

УДК 615.038 : 617-001.17-085.2

И.Б. Шукуров, В.И. Шукурова, С.И. Шукурова, С.Ф. Сулейманов

ИССЛЕДОВАНИЕ МЕХАНИЗМА ДЕЙСТВИЯ ХИТОЗАНА ПРИ ЛЕЧЕНИИ ТЕРМИЧЕСКИХ ОЖОГОВ

Бухарский государственный медицинский институт (г. Бухара)

Работа выполнена в соответствии с планом НИР БухГосМИ по теме: «Изучение механизма действия хитозана» (ГНТП № ФА-А-14-Т-043).

Вступление. ТО (термические ожоги) - это тяжелое повреждение кожи, слизистых оболочек и тканей, вызванное воздействием высокой температуры, химических веществ, электричества и др. [3]. Актуальность проблемы особенно возросла в связи с техногенными авариями, ростом производства и др. Анализ результатов лечения ожоговых ран (ОР) показывает, что ни одно из применяемых лекарственных препаратов не является универсальным [5]. Этим обусловлен поиск средств, улучшающих регенераторно-метаболические процессы. Одно из направлений поиска - изучение биологически активных веществ при лечении ТО. К ним относится природный биостимулятор хитозан, полученный из хитина куколок тутового шелкопряда *Bombyx mori* в Институте физики и химии полимеров АН РУз. Данных о влиянии хитозана на течение регенеративных процессов соединительной и эпителиальной тканей крайне недостаточно [1, 6].

Цель работы - изучение механизма действия хитозана *Bombyx mori* при лечении ТО.

Объект и методы исследования. В работе использовали ДНК фага λ дикоого типа и рестриктазы HindIII, BamHI, EcoRI («СибЭнзим», Россия); 4 образца хитозана *Bombyx mori* были предоставлены Институтом химии и физики полимеров АН РУз. Модель ТО воспроизводили на белых беспородных крысах-самцах весом 140-160 г. В соответствии с требованиями Хельсинкской декларации по гуманному обращению с животными индукцию ТО проводили под эфирным наркозом. Моделирование ОР проводили погружением депилированного участка нижней поверхности спины в кипящую воду (экспозиция - 10 сек.). При этом режиме достигалось повреждение всех слоев кожи в зоне ожога (ТО III степени). Площадь ОР составляла 18-20 кв. см. В качестве контроля использовали кожу необожженных крыс.

Высокомолекулярную ДНК выделяли из кожи крыс модифицированным методом фенольной экстракции [4]. Образцы кожи измельчали в ступке до тонкого порошка в жидком азоте. Полученный порошок клеток кожи гомогенизировали в лизирующем буфере (20мМ трис-НСl, рН 8,0; 10 мМ ЭДТА, рН 8,0; 5% тритон X100), затем инкубировали в ледяной бане 30 мин. После инкубации гомогенат центрифугировали 30 мин. (13000 g, 40С), а затем к супернатанту добавляли РНК-азу (110 мг/мл), инкубировали 1 час при 37°C. Далее добавляли протеиназу

К (0,05 мг/мл), инкубировали 4 часа при 37°C. ДНК осаждали 0,1 объемом 3М ацетата натрия и 2 объемами этанола. Концентрацию ДНК измеряли на СФ-42 при 260 нм. Рестриктику ДНК проводили с помощью рестриктаз HindIII, BamHI, EcoRI. Реакционная смесь содержала 0,2-1 мкг ДНК в объеме 20 мкл. К раствору ДНК добавляли воду до объема 18 мкл и перемешивали. Затем добавляли 2 мкл соответствующего буфера 10-кратной концентрации, перемешивали, добавляли 1 Ед. рестриктазы, перемешивали. Полученную смесь инкубировали при 37°C в течение 18 часов. Реакцию останавливали добавлением 0,5 М ЭДТА (рН 7,6) до конечной концентрации 10 мМ. Электрофорез продуктов гидролиза ДНК проводили в 1,5%-ном агарозном геле при напряженности 3 В/см. Разделение фрагментов ДНК контролировали под ультрафиолетом.

Связывание хитозана с рестрикционными фрагментами ДНК проводили следующим образом: в пробирки вносили по 1 мкг ДНК фага λ и по 5 мкг ДНК кожи - нормальной и с ТО III степени, добавляли по 5 мкл хитозана I, II III и IV, инкубировали в течение 15 мин. при 37°C, затем в каждую пробирку добавили по 15 мкл буфера рестрикции (50 мМ NaCl, 10 мМ трис-НСl, рН 7,5, 10мМ MgCl₂, 1 мМ дитиотрейтол), 0,5 мкл HindIII. Инкубировали 1 час при 37°C. По окончании реакции в каждую пробу добавляли по 3 мкл красителя (0,25% бромфенолсиний) в буфере (0,25% ксилолцианол, 40% сахароза в воде).

Для связывания хитозана с ДНК клеток кожи готовили инкубационные смеси, содержащие по 1, 3 и 5 мкг исследуемой ДНК клеток нормальной кожи и с ОР III степени. Опытные пробы содержали соответствующие концентрации ДНК клеток кожи с ожогом и с добавлением по 5 мкл хитозана-1 и ТЕ буфера рН 8,0 до конечного объема 15 мкл. Смесь инкубировали 1 час при 37°C. Электрофорез ДНК проводили в 1,0% агарозном геле в трисацетатном буфере, рН 8,0 при напряжении 60 V. Гель фотографировали через проходящие лучи УФ трансиллюминатора.

Результаты исследований и их обсуждение.

Хитозан - это поликатион, а его олигосахариды служат углеводными векторами для переноса экзогенной ДНК в цитоплазму и в ядро клетки. Хитозан образует ионные комплексы с ДНК, при этом происходит компактизация ДНК, т.е. хитозан обладает уникальными комплексообразующими свойствами [2].

При ОР различной степени хитозан эффективно адсорбирует микробные и тканевые токсины, что приводит к регенерации и заживлению раны. Мы исследовали свойства хитозана, связанные с компактизацией и избирательным связыванием

с участками ДНК или генов. Изучены свойства 4 типов хитозана по связыванию с рестрикционными фрагментами ДНК фага λ , обработанной рестриктазой HindIII. Полученные результаты сравнивали с известной физической картой генома ДНК фага λ дикого типа.

Данные представлены на **рис. 1**. Хитозан 1 (сульфапарин) снижает содержание высокомолекулярной фракции ДНК размером 23,1 т.п.н. на 90%; на 50% - фракции размером 9,4 т.п.н. гена *ori*, ответственного за синтез ДНК; на 95% - фракции размером 4,3 т.п.н. генов *int* и *xis*, ответственных за вырезание и интеграцию. Хитозан 2 (сульфапарин-н) полностью компактизирует рестрикционные фрагменты с низкой мол. мас., за исключением высокомолекулярной фракции ДНК размером 23 т.п.н., концентрация которой сохранена на 95-100% (дорожка 2). Свойства хитозана 3 (аскорбат хитозана) и 4 (н-аскорбат хитозана) не связываются с ДНК почти идентичны, но хитозан 3 примерно на 15-20% эффективнее компактизирует рестрикционные фракции ДНК (дорожки 3, 4).

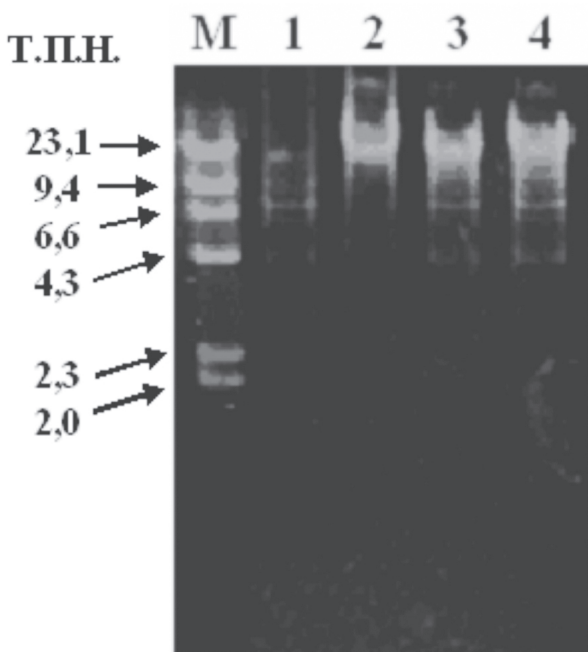


Рис 1. Электрофоретическое разделение продуктов гидролиза ДНК бактериофага λ рестриктазой Hind III в присутствии различных типов хитозана: М - маркер λ /Hind III; 1 - хитозан 1; 2 - хитозан 2; 3 - хитозан 3; 4 - хитозан 4.

Анализ данных позволяет заключить, что все 4 типа хитозана заметно отличаются между собой по способности соединяться с ДНК, а также избирательно компактизоваться с фрагментами ДНК фага λ , рестриктированной Hind III. Суммируя полученные данные, можно сделать вывод о том, что хитозан 1 (сульфапарин) по сравнению с другими типами эффективнее связывается с ДНК.

В следующей серии экспериментов проведены исследования по изучению связывания хитозана 1 с

ДНК, выделенной из клеток кожи крыс с ожогом III степени. На **рис. 2** представлены результаты электрофоретической подвижности в агарозном геле как интактной ДНК, так и ДНК, выделенной из клеток кожи крыс с ожогом III степени, обработанной хитозаном 1 (сульфапарин).

Анализ данных **рис. 2** показывает, что при ожоге III степени наблюдается заметная разница электрофоретической подвижности интактной ДНК и уровня ее фрагментации (дорожки 2, 3, 4). При обработке ДНК хитозаном 1 происходит компактизация хитозана с фрагментированной ДНК (дорожки 5, 6, 7). Полученные данные свидетельствуют о том, что хитозан обладает выраженной способностью поглощать фрагментированные молекулы ДНК. Способность хитозана к компактизации с ДНК клеток приводит к активации репаративных процессов, происходящих в ядерном аппарате клетки, а также к регенерации обожженных клеток [5]. На основании полученных результатов можно сделать вывод о том, что хитозан 1 примерно на 50-70% компактизирует мелкие фрагменты ДНК.

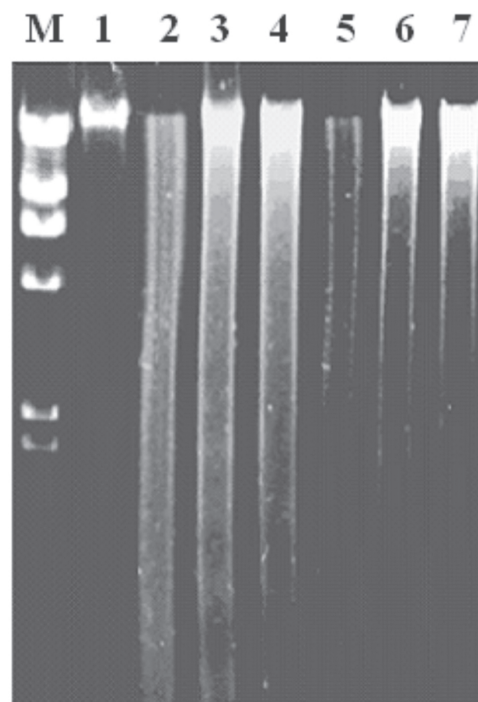


Рис 2. Электрофореграмма связывания хитозана-1 с ДНК клеток кожи белых беспородных крыс. Примечание: дорожки М - маркер 1мкг ДНК фага λ /20 ЕД Hind III; 1 - 1 мкг ДНК из клеток нормальной кожи; 2, 3, 4 - 1, 3 и 5 мкг ДНК клеток кожи с ожогом III степени; 5, 6, 7 - 1, 3 и 5мкг ДНК клеток кожи с ожогом III степени с применением по 5 мкл хитозана-1.

Итак, применение хитозана 1 при лечении ТО III степени, вероятно, приводит к восстановлению процессов репликации и транскрипции ДНК.

Выводы. Хитозан-1 (сульфапарин) обладает способностью к компактизации с молекулой ДНК фага λ , расщепленной рестриктазой Hind III. Хитозан 1 (сульфапарин) обладает способностью к

избирательному связыванию с участками ДНК фага λ ori-, int- и xis-, которые отвечают соответственно за синтез ДНК, вырезание и интеграцию. Показано, что обработка ДНК, выделенной из клеток ткани ожога III степени, хитозаном 1 (сульфапарин) приводит к активации процессов репарации и регенерации обожженных клеток.

Перспективы дальнейших исследований. Работы в этом направлении будут продолжены. Намечается использование хитозана при увеличении объемов ожога кожи. Будут детально исследованы молекулярно-биохимические свойства хитозана, его патофизиологическое влияние на процессы репарации и регенерации у животных с III степенью ожога.

Список литературы

1. Иванушко Л.А. Антибактериальные и антиоксидантные свойства хитозана и его производных / Л.А. Иванушко, Т.Ф. Соловьева, Запорожец Т.С. [и др.] // Тихоокеанский мед. журн. - 2009. - № 3. - С. 82-85.
2. Кривцов Г.Г. Адресная доставка функциональных генов в генотерапии с помощью углеводов-содержащих векторов / Г.Г. Кривцов, Р.И. Жданов // Вопр. мед. хим. - 2000. - № 3. - С. 28-34.
3. Спиридонова Т.Г. Патогенетические аспекты лечения ожоговых ран / Спиридонова Т.Г. // Росс. мед. журн. - 2002. - Т. 10, № 8-9. - С. 395-399.
4. Шипицина Г.И. Выделение тиреоглобулиновой мРНК из клеток узлового эутиреоидного зоба человека и синтез комплементарной ей ДНК / Г.И. Шипицина, Б.А. Атаханова, Д.А. Кадырова, Я.Х. Туракулов // ДАН СССР. - 1988. - Вып. 294, № 8. - С. 1486-1492.
5. Cho M.H. Chitosan treatments affect growth and selected quality of sunflower sprouts / M.H. Cho, H.K. Prinyawiwatkul // Food Sci. - 2008. - № 1. - P. 70-77.
6. Shahabuddin L. Characterization of skin reconstructed on a chitosan-cross-linked collagen-glycosaminoglycan matrix / L. Shahabuddin, F. Berthod, O. Damour, C. Collombel // Skin Pharmacol. - 1990. - V. 3, № 2. - P. 107-114.

УДК 615.038: 617-001.17-085.2

ДОСЛІДЖЕННЯ МЕХАНІЗМУ ДІЇ ХІТОЗАНУ ПРИ ЛІКУВАННІ ТЕРМІЧНИХ ОПІКІВ

Шукуров І.Б., Шукурова В.І., Шукурова С.І., Сулейманов С.Ф.

Резюме. Вивчено механізм дії хітозану при лікуванні термічних опіків. Хітозан знижував концентрації високомолекулярної фракції ДНК. При опіках III ступеня при обробці ДНК хітозаном відбувається компактизація хітозану з фрагментованою ДНК. Здатність хітозану до компактизації з ДНК клітин призводить до активації репаративних процесів, що відбуваються в ядерному апараті, і до регенерації обпалених клітин.

Ключові слова: опіки, хітозан, ДНК, комплекси, поліморфізм, рестрикція.

УДК 615.038 : 617-001.17-085.2

ИССЛЕДОВАНИЕ МЕХАНИЗМА ДЕЙСТВИЯ ХИТОЗАНА ПРИ ЛЕЧЕНИИ ТЕРМИЧЕСКИХ ОЖОГОВ

Шукуров И.Б., Шукурова В.И., Шукурова С.И., Сулейманов С.Ф.

Резюме. Изучен механизм действия хитозана при лечении термических ожогов. Хитозан снижал концентрации высокомолекулярной фракции ДНК. При ожогах III степени при обработке ДНК хитозаном происходит компактизация хитозана с фрагментированной ДНК. Способность хитозана к компактизации с ДНК клеток приводит к активации репаративных процессов, происходящих в ядерном аппарате клетки и к регенерации обожженных клеток.

Ключевые слова: ожоги, хитозан, ДНК, комплексы, полиморфизм, рестрикция.

UDC 615.038 : 617-001.17-085.2

Research Of The Mechanism Of Action Chitosan At Treatment Of Thermal Burns

Shukurov I.B., Shukurova V.I., Shukurova S.I., Suleymanov S.F.

Summary. The action mechanism of chitosan studied at treatment of thermal burns. Chitosan reduced concentration of high-molecular fraction of DNA. At burns of III rate under treatment of DNA by chitosan the compaction of chitosan with fragmented DNA. Chitosan ability to compact with DNA cells leads to repair process activation what happens in the cell nuclear system and to regeneration of burned cells.

Key words: burns, chitosan, DNA, complexes, polymorphism, restriction.

Стаття надійшла 6.02.2012 р.