

Изучение влияния ультразвуковых волн в низкочастотном диапазоне на состояние пептидного регулятора иммунитета (гексапептида иммунофана) в эксперименте, для комплексного лечения впч-ассоциированной патологии шейки матки

Карева Елена Николаевна, д.м.н., профессор кафедры молекулярной фармакологии и радиобиологии им. академика П.В.Сергеева ГБОУ ВПО РНИМУ им. Н.И.Пирогова, профессор кафедры фармакологии лечебного факультета ГБОУ ВПО Первый МГМУ им. И.М.Сеченова, г. Москва, Большая Пироговская, д. 9а, каб. 57, тел. 8(499)246-60-05, e-mail:

elenakareva@mail.ru

Кононова Ирина Николаевна, к.м.н., доцент кафедры акушерства и гинекологии ГБОУ ВПО УГМУ, г. Екатеринбург, Репина, 3; тел. 89043824116; e-mail: irkon@e1.ru

Обоскалова Татьяна Анатольевна, д.м.н., профессор, зав. каф. акушерства и гинекологии ГБОУ ВПО УГМУ, г. Екатеринбург, Репина,3; тел. 89122837631; e-mail:

oboskalova.tat@yandex.ru

Назаров Константин Сергеевич, начальник цеха синтеза ООО НПП "Бионокс", тел. 8-926-149-28-37, e-mail: konst.nazar@gmail.com

Локшин Семен Лейбович, директор ООО «Фотек», тел.89122425079, e-mail:

89122425070@mail.ru

Резюме

Проведенное экспериментальное исследование по изучению стабильности гексапептида иммунофана в водном растворе при разных режимах воздействия ультразвуковыми волнами в низкочастотном диапазоне (25 кГц) доказало, что гексапептид аргинил-альфа-аспартил-лизил-валил-тирозил-аргинин (Имунофан) не разрушается при воздействии ультразвука использованной частоты и мощности.

Введение

По данным многочисленных исследований персистирующая папилломавирусная инфекция приводит к развитию воспалительного процесса во влагалище и в шейке матки, поскольку экспрессирующийся высокоонкогенными типами ВПЧ онкобелок E7, считающийся общепризнанным специфическим опухолевым маркером в тканях шейки матки, вызывает иммуносупрессию на местном уровне при переходе вируса в стадию интегративной инфекции [1-4]. При этом нарушения иммунной противовирусной защиты организма сопровождаются усилением повреждающего действия свободнорадикальных и перекисных соединений, увеличением активности воспалительной реакции [5]. Изменения местного иммунитета, сопровождающие развитие дисбиотических процессов в шейке матки, способствующие реализации генитальных вирусных инфекций, вызывают трудности лечения хронически протекающих инфекционных процессов в шейке матки, способствующих рецидивированию и прогрессированию цервикальных неоплазий [6;7].

В этой связи патогенетическая комплексная терапия должна быть основана на применении препаратов, направленных на восстановление противовирусного иммунитета, усиление системы антиокислительной защиты с целью инактивации свободнорадикальных повреждающих агентов и уменьшение проявлений воспалительной реакции [8;9].

При выборе иммуномодулирующего препарата для комплексного лечения патологии шейки матки кавитированными растворами наибольшего внимания заслуживают пептидные регуляторы иммунитета, поскольку анализ гексапептида (аргинил-альфа-аспартил-лизил-валил-тирозил-аргинина) в тесте первичной иммуно-фармакологической оценки показал увеличение его активности в 1000 раз по сравнению с ранее полученным комплексом пептидных гормонов тимуса Тактивинном. На основе оригинального синтетического гексапептида создана лекарственная форма в виде 0,005% раствора Имунофана по 1,0 мл в ампулах для подкожных и внутримышечных инъекций. Результаты клинического изучения Имунофана демонстрируют достижение важнейших эффектов: коррекцию иммунной и окислительно-антиокислительной систем защиты организма, а также торможение репликации вирусов [10;11].

Большое значение имеет и способ доставки лекарственного средства к патологическому очагу. Ультразвуковая кавитация лечебного раствора не только обеспечивает мелкодисперсное распыление препарата, способствующее проникновению в межклеточные пространства вагинального и цервикального эпителия, фонофорез препарата на глубину 8мм, но и обладает прямым бактерицидным действием, разрушая мембрану микробных агентов. Одновременно с этим обеспечивается высокоамплитудный массаж тканей влагалища гидродинамическими потоками, инициируемыми акустическими течениями в промежуточном лекарственном растворе, а также усиление массообмена в прилежащих к влагалищу кровеносной и лимфатической системах органов и систем малого таза. Благодаря комплексному влиянию на организм ультразвука и вводимого с его помощью лекарственного вещества удается не только достичь лечебного эффекта при значительно меньшей дозировке, но и избежать тех побочных реакций, которые наблюдаются при других видах введения медикаментозных веществ [12].

Кавитированная («озвученная») жидкость характеризуется наличием кавитационных пузырьков и активных химических веществ – перекиси водорода, ионов водорода и кислорода. При ультразвуковом воздействии на ткани кавитированной жидкости имеется сочетанное механическое воздействие струи жидкости и измененных физико-химических свойств кавитированного раствора [13].

Для обоснования применения кавитированных растворов пептидных регуляторов иммунитета при ВПЧ-ассоциированной патологии шейки матки необходимо исследование стабильности изучаемого гексапептида при воздействии ультразвуковыми волнами в низкочастотном диапазоне.

Цель исследования: изучение стабильности гексапептида имунофана в водном растворе при разных режимах воздействия ультразвуковыми волнами в низкочастотном диапазоне (25 кГц).

Материалы и методы.

Экспериментальное исследование включало в себя обработку низкочастотным ультразвуком раствора гексапептида Имунофана. Для озвучивания гексапептида применялся кавитационный аппарат «ФОТЕК АК 101», разработанный и изготовленный компанией ФОТЕК (г. Екатеринбург) в комплекте с ультразвуковым акустическим узлом AA208.

Воздействие на раствор производилось ультразвуковыми колебаниями различного уровня с частотой 25 кГц. Для озвучивания применялся раствор гексапептида 5 мкг/мл – 1 мл раствора Имунофана (1 ампула), разведенный в 50 мл физиологического раствора.

После «озвучивания» раствор гексапептида был подвергнут изучению на сохранение целостности структуры пептидного регулятора иммунитета с помощью электрофореза в инертном носителе. В качестве маркеров использовались моно-, ди- и три-пептиды – продукты гидролиза иммунофана.

Схема исследования №1:

Способ ультразвукового воздействия: кавитирование раствора, проходящего через волновод акустического узла.

№ пробы	Способ подачи раствора в акуст. узел	Уровень колебаний		
		20	40	80
1	Капельный			
2	Струйный			
3	Капельный		Нагрев до 32 °С	
4	Струйный			
5	Капельный			Нагрев до 38 °С
6	Струйный			

Схема исследования №2:

Способ ультразвукового воздействия: кавитационное барботирование 10 мл раствора иммунофана ультразвуковым инструментом в пластиковой пробирке.

№ пробы	Время воздействия УЗ (сек)	Уровень колебаний
1	30	80
2	60	80
3	120	80

Для выявления изменений иммунофана под действием ультразвука была выбрана масс-спектрометрия MALDI-TOF, (matrix-assisted laser desorption-ionization – time of flight). Этот метод позволяет определять молекулярные массы пептидов, в том числе фрагментов исходного пептида, если таковые могут образовываться при воздействии ультразвуком на исходный препарат.

Масс-спектры были зарегистрированы на MALDI-TOF масс-спектрометре Bruker Ultraflex TOF/TOF (Bruker Daltonics, ФРГ), оснащенном лазером с активной средой из алюмо-иттриевый гранат («YAG», Y3Al5O12) легированный ионами неодима (Nd). Использовалась излучение с длиной

волны 355 нм ($\lambda=355$ нм). Масс-спектрометр оборудован системой задержки экстракции ионов Bruker PAN и аппаратурой для регистрации tandemных масс-спектров LIFT.

В качестве MALDI матрицы, вмещающего вещества, обеспечивающего уменьшение энергии десорбции и обеспечивающего ионизацию, использована 3,5-дигидроксibenзойная кислота.

Исследуемые образцы непосредственно на стальной масс-спектрометрической подложке (мишени) смешивали с раствором 3.5 дигидроксibenзойной кислоты (Bruker, 10 мг/мл в 50% ацетонитриле в воде с 0,5 % ТФУ) в равных объемах (по 0,5 мкл). Полученную смесь высушивали на воздухе.

Спектры, зарегистрированные в рамках представленной работы, получены в режиме положительных ионов с использованием рефлектрона.

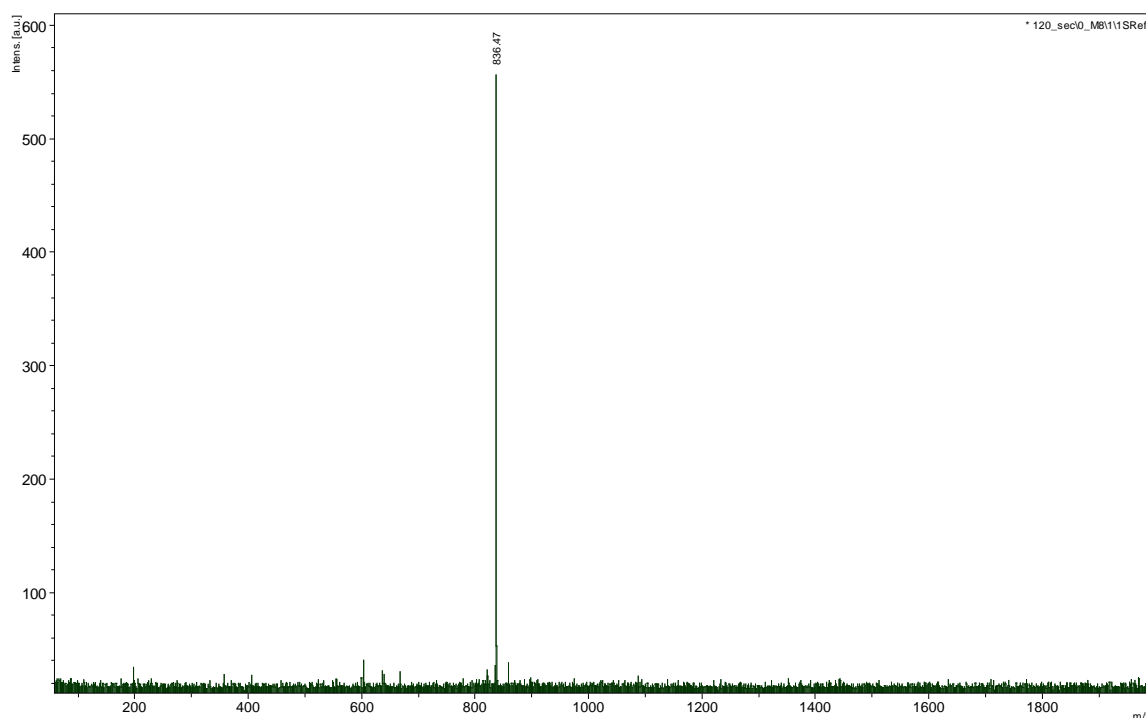
Результаты и обсуждение.

Для анализа были взяты три образца раствора: первый - исходный раствор иммунофана, второй – при максимальном воздействии на иммунофан (при барботировании и воздействии ультразвука в течение 120 секунд и уровне колебаний 80, проба 3 из схемы 2).

При кавитировании раствора, проходящего через волновод акустического узла (схема исследования № 1) раствор в акустический узел подавался с помощью инфузионной системы. При капельной подаче раствора скорость инфузии была равна 15 мл/мин, а при струйной подаче 130-150 мл/мин. При капельной подаче раствора в акустический узел и уровне колебаний 40 - 80 единиц происходил нагрев подаваемого раствора до температуры 32-38 °С.

При проведении кавитационного барботирования (схема исследования №2) после УЗ воздействия в течении 60 сек. раствор в пробирке нагревался до 26-28 °С, после УЗ воздействия в течении 120 сек. раствор в пробирке нагревался до 40 °С, волновод (концентратор ультразвуковых колебаний) нагревался до 60 °С.

Результаты масс-спектрометрии представлены на масс-спектре.



Масс-спектр. Выявление возможных продуктов распада имунофана при максимальном воздействии ультразвука.

Как следует из зарегистрированных масс-спектров, пептид аргинил-альфа-аспартил-лизил-валил-тирозил-аргинин, являющийся действующим веществом препарата Имунофан, присутствует в образце до воздействия ультразвуком, и после воздействия УЗ с максимальной мощностью и максимальной продолжительностью.

Таким образом, можно сделать вывод, что гексапептид аргинил-альфа-аспартил-лизил-валил-тирозил-аргинин (Имунофан) не разрушается при воздействии ультразвука использованной частоты и мощности.

Литература.

- Кондриков Н.И. Современная терминология гистофизиологических процессов и некоторых доброкачественных изменений шейки матки. В: Прилепская В.Н. (ред.) Патология шейки матки и генитальные инфекции. М: МЕДпресс-информ. 2008; 36-41.
- Прилепская В.Н. Патология шейки матки и генитальные инфекции. М: МЕДпресс-информ. 2008.
- Bosch F.X., Lorincz A., Munoz N. et al. The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer. Clin.Pathol.2002; 55:244-265.
- Роговская С.И. Папилломавирусная инфекция нижних отделов гениталий: клиника, диагностика, лечение [Диссертация]. Москва 2003; 1-235.
- Долгушина В.Ф., Ахматова А.Н., Телешева Л.Ф., Абрамовских О.С. Персистенция папилломавирусной инфекции у женщин с хроническим цервицитом. Уральский медицинский журнал. 2010; 3-68: 91-94.
- Киселев В.И, Аполихина И.А, Муйжнек Е.Л, Денисова Е.Д. Патогенетические подходы к лечению ВПЧ-ассоциированных заболеваний шейки матки. В: Прилепская В.Н. (ред.) Патология шейки матки и генитальные инфекции. М: МЕДпресс-информ. 2008; 87-93.
- Кунцевич Л.Д., Шибаева Е.В., Комарова В.Д., Копытова Т.В., Пышкина Е.И., Щелчкова Н.А. Значение местного применения индукторов интерферона в комплексном лечении женщин с папилломавирусной инфекцией. Акушерство и гинекология.2010; 6: 49-53.
- Молочков А.В. Комплексный подход к терапии генитальной папилломавирусной инфекции. Материалы Всероссийского научного форума «Мать и дитя».28.09.-1.10. Москва. 2010.
- Перламутров Ю.Н., Чернова Н.И. Современные подходы в терапии пациентов с папилломавирусной инфекцией гениталий. Эффективная фармакотерапия в акушерстве и гинекологии. 2010;1:25.
- Алонова С.В. Нарушения иммунного и интерферонового статуса у больных хроническим пиелонефритом и их коррекция иммуномодулятором имунофаном. Автореф. дисс...канд.мед.наук: 14.03.09. / С.В.Алонова; Башкирская гос. мед.акад. - Уфа. – 2004. - 22с
- Лебедева М. И. Применение регуляторного олигопептида в комплексном лечении воспалительных заболеваний шейки матки, ассоциированных с вирусом папилломы человека / М.И. Лебедева // Вестник Российского государственного медицинского университета. - 2008. - № 5. - с.34-37.
- Vestn Khir Im Grek. Ultrasonic cavitation and ozonization in treatment of patients with pyonecrotic complications of diabetic foot syndrome. Orthopaedic Research. 2011; 170 (1): 48-53.
- Обоскалова Т.А., Глухов Е.Ю., Лаврентьева И.В. и др. Лечение заболеваний женских половых органов с использованием лекарственных растворов, кавитированных низкочастотным ультразвуком. Екатеринбург, 2012;47.