

ПОЛИПЕПТИДЫ ИЗ КОКОНА *BOMBYX MORI* И ИХ БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ

<https://zenodo.org/deposit/8342104>

О.М. Намозов

*Ташкентский технический государственный университет, Ташкент,
Узбекистан*

У.К.Иногамов

*«Институт биофизики и биохимии» при Национальном университете
Узбекистана, Ташкент, Узбекистан*

М.М. Каримов

Т.М. Бабаев

Национальный университет Узбекистана, Ташкент, Узбекистан

Реферат. *Получены полипептиды для применения в качестве носителей в полимерных лекарственных формах содержащих макро- и микроэлементы. Установлено, что оптимальными условиями для получения с максимальным выходом водорастворимых полипептидов со средней молекулярной массой 70000-75000 кДа методом гидролиза кокона тутового шелкопряда (*Bombyx mori*) растворами едких щелочей (NaOH, KOH) являются: концентрация раствора щёлочи – 0,250 н, температура системы – 373К, время реакции – 80 минут. Исследованиями *in vivo* определено, что полученные полипептиды не оказывают отрицательного воздействия на состояние здоровья животных, не вызывает местно-раздражающего действия на кожу и слизистые оболочки глаз, не обладают кумулятивным свойством.*

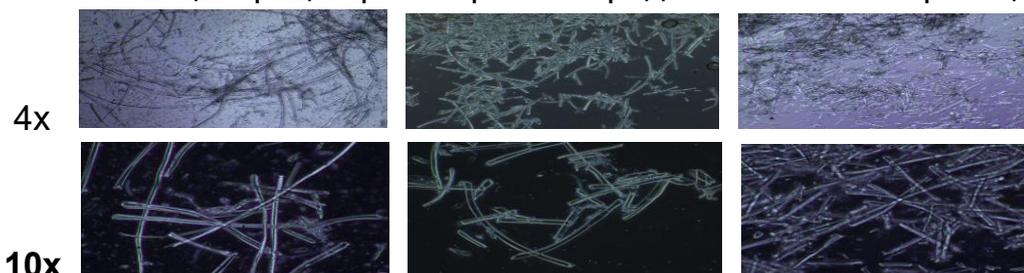
Ключевые слова: *полипептиды из *Bombyx mori*, полимерная подложка, гидролиз, потенциометрия, микроскопия, электрофорез, токсичность, местно-раздражающее действие, кумулятивность, морфология, биохимия.*

Из научной литературы известно, что серицин и фиброин, выделенные из кокона *Bombyx mori*, обладают определённой физиологической активностью [1, 2], но условия получения обладающих различными функциональными группами полипептидов из него щелочным гидролизом и их биологическая активность остаются малоизученными. Целенаправленные исследования условий получения водорастворимых полипептидов и их физиологической активности послужат основой для разработки новых перспективных лекарственных форм на основе их поликомплексов с макро- и микроэлементами. Целью настоящей работы являлось установления

оптимальных условий получения полипептидов большой молекулярной массой с максимальным выходом и определение фармакологического воздействия их на состояние животных.

Кокон *Bombyx mori* имеет белковую природу, поэтому под воздействием растворов едких щелочей легко гидролизуетс сначала до полипептидов, а при глубоком гидролизе и до отдельных аминокислот [3]. Исследование влияния условий гидролиза кокона тутового шелкопряда водными растворами NaOH и KOH проводили при температурах 323К, 343К, 373К и концентрации щелочей от 0.09 н до 0.625 н, а также продолжительности реакции до 210 минут. Глубину реакции гидролиза оценивали косвенно методом потенциометрии, установлением величины изменения ΔpH системы в ходе процесса. Установлено, что увеличение концентрации, продолжительности времени гидролиза и температуры системы приводит к углублению процесса. Необходимо отметить, что при проведении процесса при 323К оптимального состояния продукта реакции - гомогенного водного раствора полипептидов не достигается даже при длительном времени (210 минут), а при проведении процесса при 343К оптимальное состояние продукта реакции достигается только при высокой концентрации щелочи (0,625н) и после 85 минут прохождения реакции. Цель достигается при проведении процесса при 373К при концентрации 0,250 н и после 80 минут прохождения реакции.

Все продукты реакции после нейтрализации исследовали на инвентированном фазово-контрастном микроскопе «Evos XL Cote» (Германия) – четырёхкратном (4x), десятикратном (10x), двадцатикратном (20x) и сорокакратном (40x) увеличении объектива. Увеличение температуры от 323К до 373К положительно влияет на процесс гидролиза кокона тутового шелкопряда (рис.1), это объясняется увеличением количества взаимодействий молекул щелочи с белками или с полипептидами, образующимися в ходе реакции при повышении температуры системы. Повышение концентрации щелочи в растворе и продолжительности реакции также приводит к углублению реакции гидролиза, что можно объяснить увеличением количества взаимодействий молекул щелочи с белками или с полипептидами, образующимися в ходе реакции соответственно при повышении концентрации раствора или продолжительности реакции.



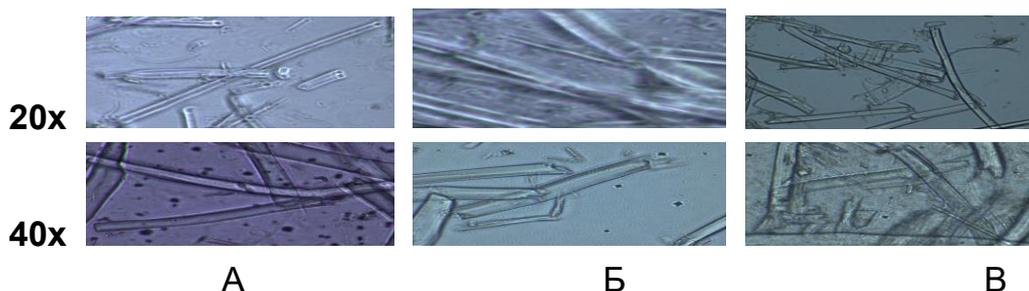


Рис. 1. Микроскопические снимки продуктов гидролиза кокона тутового шелкопряда раствором NaOH при концентрации – 0,625 н, продолжительности времени гидролиза 90 мин., увеличении объектива в 4, 10, 20, 40 раз при температурах: А – 323К; Б - 343К; В – 373К.

Определено влияние природы щелочи на процесс гидролиза кокона тутового шелкопряда на примере исследований с применением KOH и NaOH. Обработка результатов потенциометрии методом математического статического анализа показало более сильного воздействия NaOH на данный процесс. Во всех последующих исследованиях образцы предварительно нейтрализовывались до pH = 6,8-7,2 добавлением необходимого количества водного концентрированного раствора HCl.

Методом электрофореза определены молекулярная масса полипептидов полученных в ходе экспериментов. Исследования проводились на приборе марки Electrophoresis Power Supply (Германия). В качестве стандартного белка был взят серицин с молекулярной массой 220000 кДа. Из рис. 2 видно, что продукты гидролиза полидисперсны, состоящие как низкомолекулярных (≤ 8000 кДа), так и высокомолекулярных (> 240000 кДа) фракций.

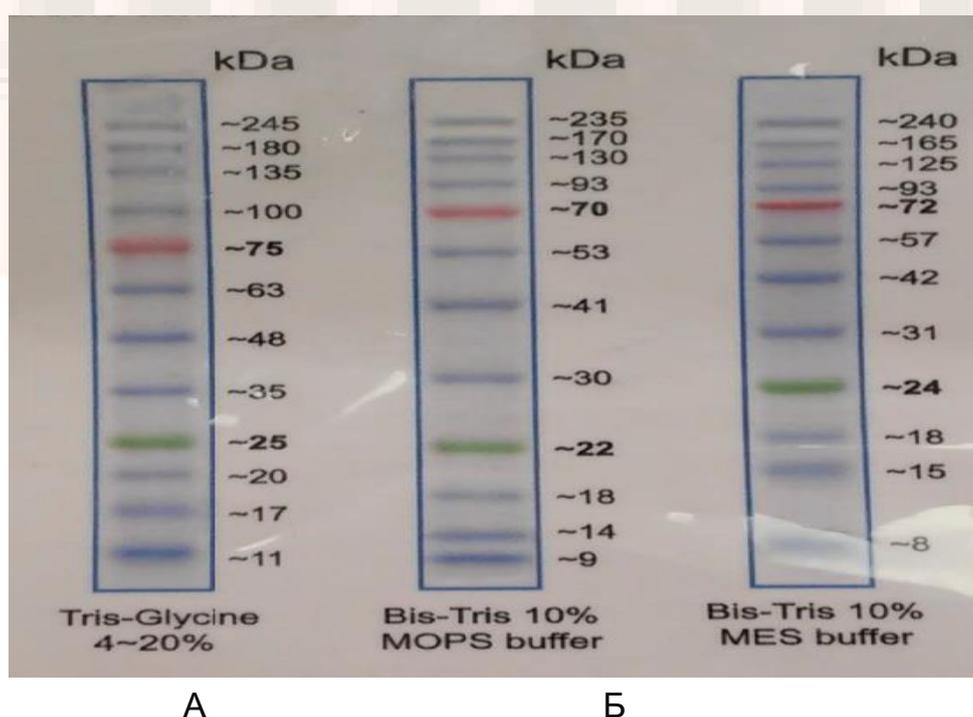


Рис. 2. Фотография маркеров смешения продуктов реакции гидролиза кокона тутового шелкопряда раствором NaOH при условиях: А) $C = 0,625$ н; $T = 373K$; $t = 60$ мин.;

Б) $C = 0,375$ н; $T = 373K$; $t = 60$ мин.; В) $C = 0,250$ н; $T = 373K$; $t = 80$ мин.

Обработка полученных результатов позволяет утверждать, что оптимальными условиями для получения с максимальным выходом водорастворимых полипептидов со средней молекулярной массой 70000-75000 кДа методом гидролиза кокона *Bombyx mori* растворами щелочей (NaOH, KOH) являются: концентрация раствора щёлочи (C) – 0,250 н, температура системы (T) – 373K, продолжительность реакции (t) – 80 минут.

Исследование острой токсичности полученных в оптимальных условиях полипептидов проводили на белых мышах введением специальным зондом перорально в дозах 1000 - 5000 мг/кг. В ходе исследований погибших животных не обнаружено. Таким образом, средняя летальная доза исследуемого образца взятой в эксперимент, не достигнута. Полученные методом гидролиза кокона *Bombyx mori* полипептиды относятся к V классу практически нетоксичным соединениям.

Как известно [4] конъюнктивальная проба является очень чувствительным тестом и в ряде случаев даже позволяет выявить реакцию животных на аллерген, при слабой аллергизации и отрицательных кожных тестах. Опыты были поставлены на 10 кроликах, массой 2,5-3,0 кг, которым в левый глаз закапывали 0,5 и 5% раствора препарата, во второй глаз (контрольный) вводили 0,1 мл дистиллированной воды. Реакцию учитывали через 15 минут (быстрая реакция) и через 24-48 часов (гиперчувствительность замедленного типа) и оценивали по следующей шкале (в баллах) [5]:

- легкое покраснение слезного протока;
- покраснение слезного протока и склеры в направлении к роговице;
- покраснение всей конъюнктивы и склеры.

Кроме того, учитывали степень гиперемии, отечность, лакримацию. Результаты наблюдений показали, что исследуемый образец ни через 15 минут, ни через 24 и 48 часов не вызывает даже легкого покраснения.

Исследование кожно-раздражающего действия проводили на 15 крысах введением автоматической пипеткой дистиллированную воду (контроль), а в два левых 0,5 и 5% раствора образца в объеме 0,05 мл. Полученные данные показали, что исследуемый образец в 0,5 и 5% концентрациях не вызывает раздражения, покраснения, отека или других видимых изменений кожи и действие оценивается в 0 баллов.

На основе выше представленных данных можно сделать вывод, что полипептиды, полученные методом гидролиза кокона *Bombyx mori* в 0,5 и 5%

концентрациях не оказывает раздражающего действия как на слизистую глаза кроликов, так и кожу крыс.

Изучение кумуляции было проведено по методу Lima и других [5], позволяющих оценить не только кумуляцию, но и привыкание. Опыты были поставлены на 10 мышах обоего пола с начальной массой тела 20 ± 2 г. Препарат вводили перорально по представленной в таблице 1 схеме.

Таблица 1.

Схема введения мышам полипептидов, полученных гидролизом кокона *Bombyx mori*.

Максимальная продолжительность эксперимента 24 ± 4 дней.

Дни введения	Количество погибших животных / всего	Доля от LD ₅₀	LD ₅₀ >5000мг/кг
1-4	0/10	0,1	500
5-8	0/10	0,15	750
9-12	0/10	0,22	1100
13-16	0/10	0,34	1700
17-20	0/10	0,50	2500
21-24	0/10	0,75	3750

На основе полученных результатов по методике [5] рассчитывали $K_k = LD_{50n} / LD_{50 1}$, где K_k = коэффициент кумуляции, LD_{50n} – средняя смертельная доза при n-кратном введении, $LD_{50 1}$ – средняя смертельная доза при однократном введении. По данной методике если $K_k > 1$ привыкание; $K_k \leq 1$ кумуляция. Как видно из приведенных выше данных исследуемый образец, не обладает кумулятивным действием.

В последующем животных (мышей), участвовавших в предыдущем эксперименте, забивали по истечению периода наблюдений, брали кровь для подсчета форменных элементов в периферической крови, выделяли сыворотку крови для биохимических исследований, проводили макроскопический осмотр и взвешивание внутренних органов. Состояние животных оценивали по следующим параметрам периферической крови: содержанию гемоглобина, числу эритроцитов, гематокрита, по среднему объёму эритроцитов в кубических микрометрах (MCV), среднему содержанию гемоглобина в отдельном эритроците в абсолютных единицах (MCH), средней концентрации гемоглобина в эритроцитарной массе, отражающей степень насыщения эритроцита гемоглобином (MCHC), ретикулоцитов, тромбоцитов, лейкоцитов, оценку функции печени - содержанию глюкозы, общего белка, аланин - и аспартат - аминотрансфераз (АлАТ, АсАТ) в сыворотке крови.

Результаты наблюдений, следующие: 1. За период проведения эксперимента смертность подопытных животных не наблюдалось.

2. Клинические признаки интоксикации за период проведения эксперимента отсутствовали.

3. При вскрытии животных патологоанатомических изменений органов: печени, почек, селезенки, сердце, легких, а также тимуса выявлено не было.

4. Вес тела взятых в эксперимент животных достоверно не отличался от веса животных контрольной группы (таблица 2).

Таблица 2

Усредненные показатели измерений массы животных и внутренних органов мышей при многократном пероральном введении полипептидов, полученных гидролизом кокона *Bombyx mori* по схеме: $M \pm m$; $n=10$; $P>0,05$

Группа животных	Масса мышей, г		Масса внутренних органов животных, г					
	Исходный	Через 24 дня	печень	почки	селезенка	сердце	легкие	тимус
Контроль	20±2,0	22±2,0	1,45±0,1	0,20±0,02	0,14±0,01	0,12±0,01	0,156±0,01	0,045±0,002
Подопытные	20±2,0	22±2,1	1,09±0,1	0,23±0,02	0,17±0,01	0,13±0,01	0,160±0,01	0,040±0,002

5. Морфологический состав периферической крови в подопытных животных не отличался от животных контрольной группы.

Таблица 3

Морфологический состав периферической крови при многократном пероральном введении полипептидов, полученных гидролизом кокона *Bombyx mori* по схеме: $M \pm m$; $n=10$; $P>0,05$.

Тесты	контроль	опыт
Гемоглобин, г/л	110±6,0	97±9,4
Эритроциты, $10^{12}/л$	5,4±0,1	4,8±0,1
Гематокрит, %	46±4,0	46±4,0

MCV, мкм ²	100±8.0	96±6.0
MCH, пг	29±2,0	29±2,0
MCHC, г/дл	290±16,0	320±28,0
Ретикулоциты, %	4,2±0,3	6.2±0,2
Тромбоциты, 10 ⁹ /л	325±18,5	425±21,0
Лейкоциты, 10 ⁹ /л	3,4±1,1	4,5±1,0

6. Биохимические показатели сыворотки крови не выявили различия между показателями подопытной группы животных и контрольной группой мышей.

Таблица 4

Биохимические показатели сыворотки крови при многократном пероральном введении полипептидов полученных гидролизом кокона *Bombyx mori* по схеме: M±m; n=10; P>0,05.

Группы	Общий белок, г/л	АлАТ, ммоль/л	АсАТ, ммоль/л	Глюкоза ммоль/л	Мочевина крови, ммоль/л
контроль	54±5,2	0,26±0,02	0,2±0,02	2,8±0,3	2,2±0,16
подопытная	56±5,6	0,13±0,01	0,6±0,06	2,4±0,2	2,2±0,15

Таким образом, результаты проведённых фармакологических исследований, а также исследований других учёных [7] позволяют рекомендовать полипептиды полученные гидролизом кокона *Bombyx mori* на использование в качестве полимер носителей при разработке новых перспективных лекарственных форм на основе их поликомплексов с макро- и микроэлементами.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Материалы. В экспериментах использовали образцы кокона *Bombyx mori* после термической обработки выращенного в 2015 году в Узбекистане. Изначально из всего кокона извлекали гусениц, потом проводили механическое измельчение коконов на куски неправильной формы размером 5-7 мм. В работе использовали NaOH, KOH, HCl и другие химические реагенты марки «х.ч.». Все стандарты, буферы и химические реагенты, использованные в методе электрофоретический анализ были приобретены у компании Sigma-Aldrich (Сент-Луис, США). Биохимические тесты при морфологических и биохимических исследованиях проводили с помощью тест наборов, выпускаемых фирмой ООО «Фармбиодиагностика» (Ташкент).

Гидролиз. Навеску в количестве 5,0 г кокона тутового шелкопряда промывали дистиллированной водой и помещали в коническую колбу объемом 250 мл, затем заливали раствором щелочи. В работе использовали весы марки: KERN фирмы AC/ACS (Германия). После перемешивания закрывали крышку и колбу ставили в заранее нагретый до необходимой температуры термостат (марки: MWB 20 (Германия). После прохождения требуемого времени гидролиза, колбу вынимали из термостата и охлаждали до комнатной температуры. Определяли pH раствора до и после гидролиза на pH-метре марки: EC-170 фирмы pH-mV-Temp (Сингапур). Перед проведением анализа продукта гидролиза его нейтрализовали, доводя pH раствора до значений 6,8-7,2 добавлением водного раствора концентрированной HCl.

Электрофоретический анализ. Электрофорез нейтрализованных растворов (pH = 6,8-7,2) полипептидов, полученных гидролизом кокона *Bombyx mori* в соответствии с описанным способом с небольшими изменениями, проводили по методике [6]. В качестве раствора использовали 30%-ный водный раствор геля полученного методом радикальной полимеризации акриламида с N,N-бисакриламидом (содержание 0,034% от массы акриламида) в воде при температуре 333K, в качестве инициатора использовали персульфат аммония (0,25 от веса акриламида).

Фармакологические исследования. Фармакологические исследования проводили на образцах полипептидов, полученных гидролизом кокона *Bombyx mori* растворами NaOH. Изучение «острой» токсичности проводили на белых мышах, обоего пола, массой 18 – 21 г по 6 животных в каждой группе. Испытуемый препарат вводили внутрь специальным зондом в дозах 1000 - 5000 мг/кг. После однократного введения препарата наблюдение вели ежечасно в день введения, 3 раза в день на 2-3 сутки и один раз в день последующие 14 дней опыта. Учитывали общее поведение, окраску шерсти, состояние слизистых, дыхание, сердцебиение, двигательную активность и гибель мышей.

Исследование кожно-раздражающего действия проводили на 15 крысах, массой 140 ± 10 г, которым 5-тикратно на два правых выстриженных участка кожи спины (2x2см), наносили автоматической пипеткой дистиллированную воду (контроль), а в два левых 0,5 и 5% раствора образца в объеме 0,05 мл. Оценку местного действия осуществляли на основании данных осмотра проводимого через 4 часа с момента введения препарата и последующих 7 суток эксперимента [4]. Реакцию кожи учитывали по шкале кожных проб в баллах [5].

Авторы благодарят сотрудников государственного предприятия «Центр передовых технологии» (Ташкент) и испытательного центра «Фармакологических и фармакодинамических исследований»

лекарственных средств при ИБОХ АН РУз за оказанную техническую помощь в проведении, анализе и фармакологических испытаний продуктов реакций гидролиза кокона *Bombyx mori*.

ЛИТЕРАТУРА:

1. H.J.Jin, [D.L.Kaplan](#). Nature, 424, 1057–1061. (2003).
2. Р.Х.Очилова. Патент РФ. 2385649 (2010), Бюл. изобр. №2, 47 (2010).
3. T.Gamo, T.Inokuchi, H.Laufer. Insect Biochemistry, 7, Issue 3, 285-295 (1977).
4. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. Под общей редакцией член-корр РАМН проф. Р.У.Хабриева. Москва, 2005, с. 41. с. 695.
5. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению фармакологических веществ. Москва. 2000, 498 с.
6. U.Laemmli, Nature, 227, 680 (1970).
7. Madyarov Sh. R. Turdikulova Sh. U., Salikhov Sh. I. (2019) Silk proteins as a polyfunctional matrix material in the development of advanced medicines // Proceedings of the 9th BACSA Int. Conf. "Sericulture preservation and revival - problems and prospects". 2019. Batumi, P. 257-258.