

Российская академия медицинских наук
Сибирское отделение
Институт клинической иммунологии

**ИММУННАЯ СИСТЕМА:
ФУНКЦИОНИРОВАНИЕ В НОРМЕ,
ПРИ ЭКСТРЕМАЛЬНЫХ ЭКОЛОГИЧЕСКИХ
ВОЗДЕЙСТВИЯХ, ПРИ ИММУНОПАТОЛОГИИ**

Материалы 5-й отчетной сессии
ИКИ СО РАМН

Под редакцией:
замдиректора ИКИ СО РАМН по научной работе
члена-корреспондента РАМН, профессора В. И. Коненкова

Scientific report 2000
Institute of clinical immunology
Siberian branch of Russian Academy of Medical Sciences

Новосибирск 2000



ИССЛЕДОВАНИЕ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ИНГИБИТОРА СКК, ВЫДЕЛЕННОГО ИЗ МЫШЕЧНОЙ ТКАНИ

Акименко З. А., Колесникова О. П., Кудаева О. Т.
Шушакова А. С.

В настоящее время получены данные о химической природе нескольких веществ, являющихся ингибиторами пролиферации СКК. В литературе описан макрофагальный воспалительный белок МИП-1 α . В нашей лаборатории выделен и охарактеризован препарат из свиного костного мозга. Активной субстанцией в этом препарате является β -цепь гемоглобина. Аналогичная ингибиторная активность наблюдалась также в препарате, полученном из поперечно-полосатых мышц мышцей. В предварительном исследовании было показано, что вещество, полученное из мышечной ткани (ФМ) не идентично ни гемоглобину из костного мозга, ни миоглобину.

Настоящее исследование посвящено получению ФМ в чистом виде и исследованию его физико-химических свойств.

Основной инструмент, который был использован в этих исследованиях, – высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ).

Нами были оптимизированы условия для повышения выхода ФМ в процессе его очистки. Были исследованы различные среды, используемые на стадии его наработки из мышц. Была оптимизирована первая стадия – концентрирование на фильтре «Амикон». Следующей стадией очистки мы выбрали обращенно-фазовую хроматографию в градиенте ацетонитрила. Было показано, что устойчивый результат получается на колонке с сорбентом С-18. При этом уже на первой стадии очистки достигается высокая степень чистоты препарата – до 70–80%.

Как показано нами, достаточно провести рехроматографию в аналогичных условиях для получения практически гомогенного препарата, который и был в дальнейшем использован нами для его характеристики.

Проводимые нами эксперименты показали, что абсолютные количества выделяемого нами ФМ, по-видимому, измерялись нанограммами. При работе с такими количествами вещества необходимо использовать высокочувствительные приборы и методы. ВЭЖХ является одним из таких методов.

Для характеристики этим методом мы проводили хроматографию на микроколонке с обращенно-фазовым сорбентом Нуклеосил С-18, регистрируя результирующий профиль элюции на хроматографе Милихром А-02. Как показано, полученный препарат имел 100%-ную чистоту, а его спектральные характеристики соответствовали белоксодержащей материи. В частности, снятый спектр имел характерный для белков максимум в УФ-области 206 и 280 нм. Количество анализируемого вещества, как следует из этих данных, соответствует 5 микрограммам.

Кроме этого, нами проведена хроматография на колонке с использованием другого обращенно-фазового сорбента С-16, где также показана гомогенность полученной нами материи.

Снятый масс-спектр исследуемого вещества показал, что молекулярная масса вещества не превышает 5 kD, что может соответствовать небольшому белку размером около 50 аминокислот.

Пептидная материя такой массы характеризуется с помощью тонкослойной хроматографии. Поэтому мы хроматографировали исследуемый препарат в тонком слое целлюлозы с последующим проявлением его нингидриновым реактивом. Нами показано, что исследуемое вещество проявляется нингидрином, что также свидетельствует о наличии белковой компоненты в исследуемом веществе.

RESEARCH OF PHYSICOCHEMICAL PROPERTIES OF AN INHIBITOR OF HEMOPOIETIC STEM CELL FROM A MUSCLE TISSUE

Акименко З. А., Кolesnikova О. Р., Kudaeva О. Т.,
Shushakova А. S.

At present there are some data on the chemical nature of several substances being inhibitors of HSC proliferation. In the

literature macrophage inflammatory protein MIP-1 α is described. It was chosen and described the preparation from a pork osteal brain in our laboratory. β -chain of haemoglobin was an active substance in this preparation. The similar activity was also supervised in a substance that was obtained from striated muscles of mice. In preliminary research it was shown that the substance obtained from a muscle tissue (FM) was identical to neither hemoglobin, nor myoglobin.

The aim of the present study was to derive pure FM and to investigate its physicochemical properties.

The main tool we utilised in this investigations – highly performance liquid chromatography (HPLC).

We optimized the conditions for FM increase in output. The various media used at the stage of elution from muscles were researched. The first stage – concentration on a filter Amikon was optimized. The following stage of cleaning was a reverse – phase chromatography with a gradient of acetonitrile. It was shown, that the stable outcome is received on a column with sorbent Polysil C-18. We had a high degree of purity up to 70–80%. It was shown that, it is enough to rechromatographed the substances in simulated condition for deriving practically homogeneous material.

The experiments have shown, that the absolute amounts of FM, apparently, were measured nanogramms. We have employed highly sensitive instruments and methods to characterize such little amount of substance. One of such methods is HPLC.

We conducted a chromatography on a microcolumn with reverse-phase sorbent Nucleosil C-18, registration a chromatograph Milichrom A-02. As shown, the obtained substance had 100% of purity, and its spectra corresponded to protein substance. Its maximum absorption coincide with proteins – 206 and 280 nm. The amount of analyzable substance, corresponds to 5 micrograms.

Besides, we conduct a chromatography on a column with usage of other reverse – phase sorbent – Diasorb C-16, where homogeneity of the substance, obtained by us, is also exhibited.

The removed mass spectrum of studied substance has shown, that the molecular mass of substance does not exceed 5 kD, that can correspond to small protein by a size about 50 amino acids.

Such polypeptide substance is characterized by the help of a thin-layer chromatography. Therefore we cromatographed a substance on a thin layer of cellulose with the subsequent

visualisation by ninhydrin reagent. The result confirmed that tested material contained a protein component.