

КОЛЛИГАТИВНЫЕ СВОЙСТВА РАСТВОРОВ ИНТЕРФЕРОНА АЛЬФА ЛЕЙКОЦИТАРНОГО ЧЕЛОВЕЧЕСКОГО

Миняева О.А., Ботова Д.И., Нелюбина Е.С.

ГБОУ ВПО Южно-Уральский государственный медицинский университет, Россия (454092 Челябинск, ул. Воровского, 64), e-mail: kanc@chelsma.ru

Изучены коллигативные свойства водных растворов интерферона альфа лейкоцитарного человеческого. Установлен линейный характер зависимости понижения температуры замерзания от концентрации интерферона альфа в растворе, аналогичный ранее установленным зависимостям для альбумина, иммуноглобулина нормального и иммуноглобулина противоклещевого. Это позволяет рекомендовать метод осмометрии как экспрессный и точный метод определения концентрации индивидуальных белков в водных растворах, в том числе и в лекарственных препаратах. В интервале концентраций 0 – 10 % для интерферона альфа лейкоцитарного человеческого установлена линейная зависимость эффективной осмотической концентрации и осмотического давления от содержания белка в растворе. Найдено нулевое значение константы b , учитывающей гибкость и форму макромолекул, в уравнении Галлера и доказано существование только сферической глобулярной конформации белковых макромолекул интерферона альфа лейкоцитарного человеческого в исследуемом интервале концентраций.

Ключевые слова: интерферон альфа лейкоцитарный человеческий, коллигативные свойства, осмометрия, глобулярная конформация.

COLLIGATIVE PROPERTIES OF SOLUTIONS OF HUMAN LEUKOCYTIC INTERFERON ALPHA

Minyaeva O.A., Botova D.I., Nelyubina E.S.

South Ural State Medical University, Chelyabinsk, Russia (454092, Chelyabinsk, street Vorovskiy, 64), e-mail: kanc@chelsma.ru

Colligative properties of aqueous solutions of human leukocyte interferon alpha studied. The linear dependence of freezing point depression of the concentration of interferon alpha in the solution set. This is analogous to previously obtained curves for albumin, normal and anti-mite immunoglobulins. This allows recommending osmometry method as a fast and precise method for determining the concentration of individual proteins in aqueous solutions, including pharmaceuticals. The linear dependence of the effective osmotic concentration and osmotic pressure of the protein content of the solution is installed in the concentration range of 0 - 10% for the human leukocyte interferon alpha. A zero value of the constant b , which takes into account the flexibility and shape of macromolecules in the equation Haller, found. The existence of only spherical globular conformation of protein macromolecules of human leukocyte interferon alpha in the investigated range of concentrations proved.

Keywords: human leukocyte interferon alpha, colligative properties, osmometry, globular conformation.

Белки являются основными функциональными молекулами всех видов живых организмов. Практически любая функциональная деятельность клетки – химическая, сократительная, рецепторная, транспортная, иммунная – выполняется при участии белковых молекул. В отличие от углеводов и липидов белки и составляющие их аминокислоты не способны резервироваться в организме. Интерфероны, как представители белков живых организмов, относятся к протеинам или гликопротеинам, в состав которых включено 146–166 аминокислотных остатков. Молекулярная масса интерферонов относительно невелика и составляет величину порядка 17000 [4, 6].

Интерфероны выполняют в живом организме защитные функции. Так, интерфероны оказывают противовирусное действие, индуцируя в клетках состояние резистентности к вирусным инфекциям и модулируя ответную реакцию иммунной системы, направленную на нейтрализацию вирусов или уничтожение инфицированных ими клеток. Механизм противовирусного действия заключается в создании защитных механизмов в неинфицированных вирусом клетках. Связываясь со специфическими рецепторами на поверхности клетки, интерфероны изменяют свойства мембраны клетки, предотвращают адгезию и проникновение вируса внутрь клетки, стимулируют специфические ферменты, воздействуют на рибонуклеиновые кислоты (РНК) и ингибируют синтез белков вируса. Наряду с противовирусным и иммуномодулирующим действием интерфероны обладают антимикробной активностью, способны подавлять деление онкогенных клеток при сохранении функций всех звеньев иммунной системы, оказывают защитное действие при радиационном поражении.

Лекарственные формы, содержащие интерфероны, очень широко применяются в медицине и фармации ввиду жизненно важных защитных функций данных белков в организме и возможности осуществлять эффективную терапию препаратами интерферонов. Интерфероны применяются интраназально, конъюнктивально, парентерально, в виде инъекций, входят в состав мягких лекарственных форм (суппозиторий и мазей). Соответственно возникает проблема определения концентрации действующего вещества в лекарственных формах. Согласно литературным данным в анализе белков очень широко используются хроматографические, спектральные методы анализа, а также электрофорез. Крайне незначительно применяются криоскопический анализ, осмометрия, вискозиметрия.

В связи с этим **целью данного исследования** являлось изучение коллигативных свойств водных растворов интерферона альфа лейкоцитарного человеческого на примере осмотического давления и понижения температуры замерзания, а также определение конформации молекул интерферона в водных растворах.

Материалы и методы исследования

В качестве объекта исследования использовали альфа-интерферон лейкоцитарный человеческий, произведенный ФГУП «НПО «МИКРОГЕН». Определение температуры замерзания, эффективной осмотической концентрации и осмотического давления растворов интерферона проводили при помощи автоматического криоскопического осмометра ОМТ-5 [1]. Испытуемый раствор объемом около 0,2 мл помещали в специальную пробирку, которая погружается в термостат с автоматически контролируемой температурой. Температура пробы

в термостате снижается до необходимых значений, далее включается вибратор, и переохлажденная жидкость кристаллизуется. При кристаллизации выделяется теплота кристаллизации, поэтому температура пробы поднимается до точки замерзания. По фиксированной точке замерзания раствора рассчитывается и выдается на экране прибора осмолярность раствора.

Предварительно прибор калибровали при помощи стандартных растворов хлорида натрия, в диапазоне концентраций от 0 до 2000 ммоль/кг (мОсмоль/кг) в соответствии с рекомендациями [1].

Результаты и их обсуждение

Анализ зависимостей эффективной осмотической концентрации и осмотического давления от процентной концентрации интерферона альфа лейкоцитарного человеческого в растворе показывает, что в интервале концентраций 0-10 % наблюдается линейная зависимость коллигативных свойств растворов от содержания белка (рис. 1, 2).

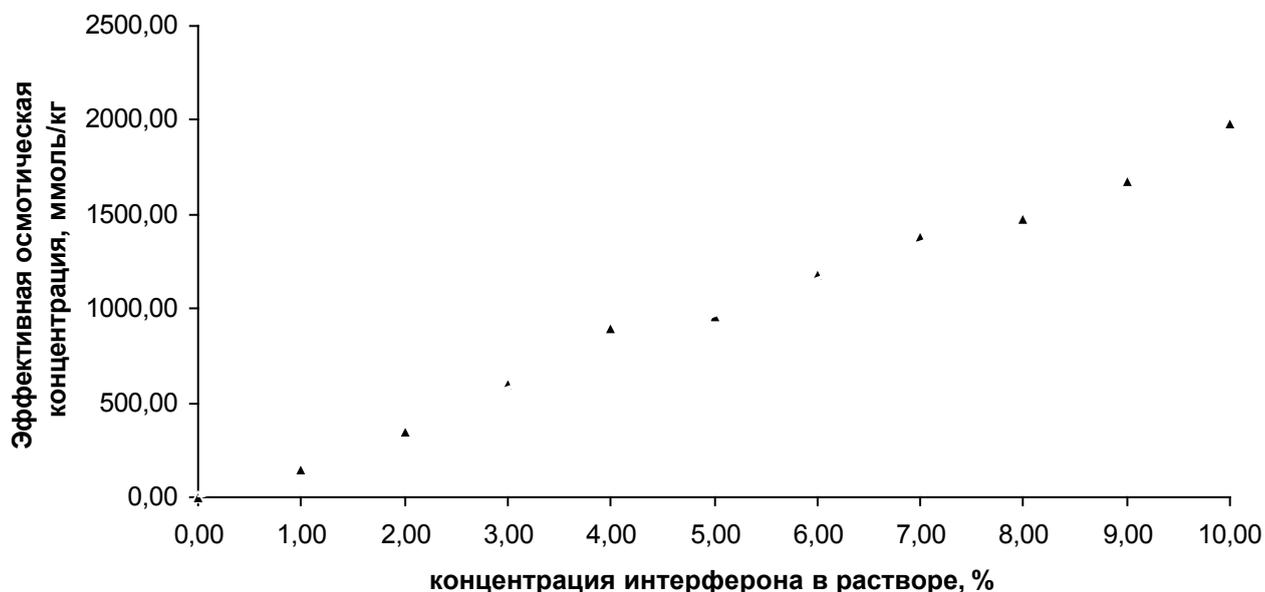


Рис. 1. Зависимость эффективной осмотической концентрации от содержания интерферона альфа лейкоцитарного человеческого в водном растворе

В [3] было показано, что коллигативные свойства растворов альбумина (понижение температуры замерзания и осмотическое давление) также линейно зависят от процентного содержания белка в растворе в интервале концентраций 0–10 %. То есть для водных растворов интерферона альфа лейкоцитарного человеческого, так же как и для водных растворов

альбумина, константа b в уравнении Галлера $\left(\pi = \frac{R \cdot T \cdot C}{M} + bC^2\right)$, учитывающая гибкость и форму макромолекул, должна быть равна нулю.

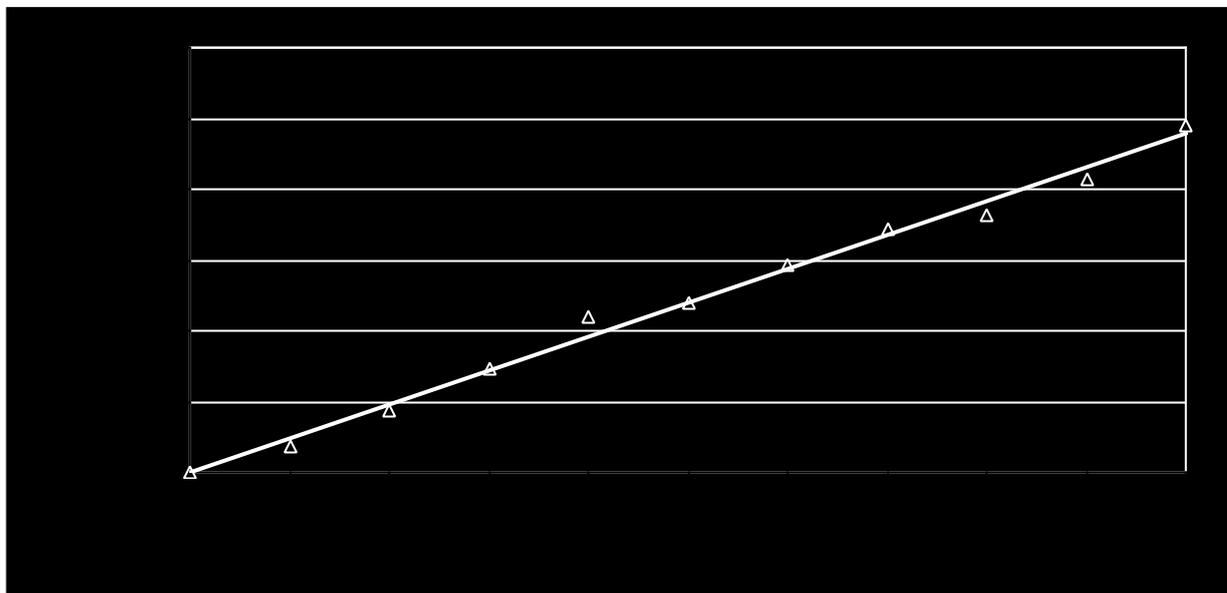


Рис. 2. Зависимость осмотического давления от содержания интерферона лейкоцитарного человеческого в водном растворе

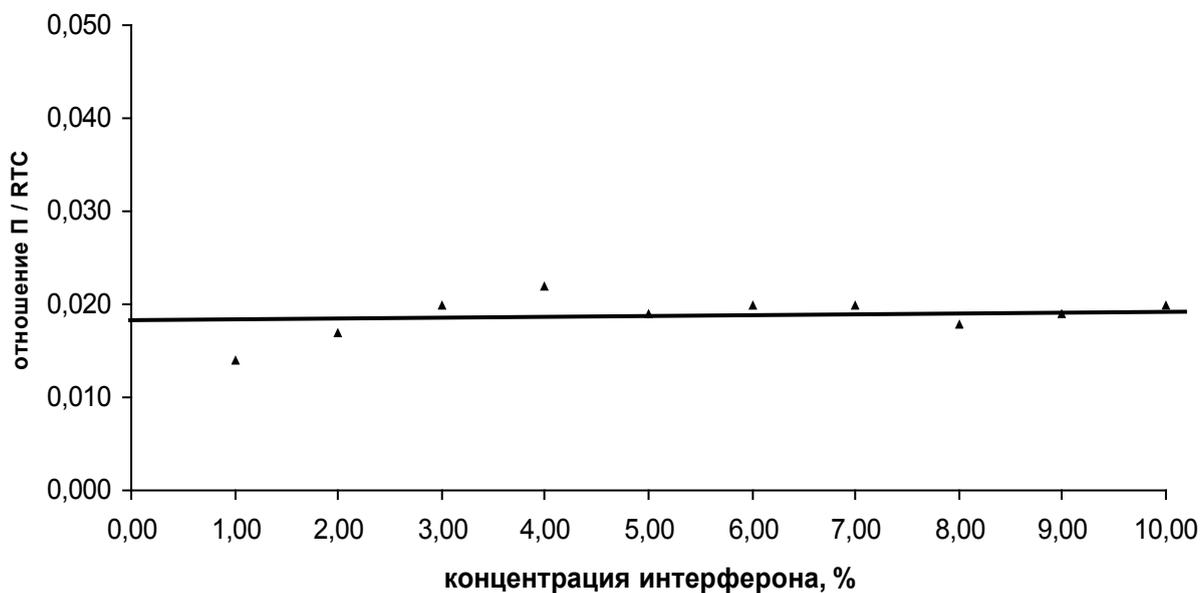


Рис. 3. Зависимость отношения $\frac{\pi}{RTC}$ от содержания интерферона лейкоцитарного человеческого в водном растворе

Действительно, зависимость $\frac{\pi}{RTC} = f(C)$ для интерферона, построенная на основании экспериментальных данных, представляет собой практически горизонтальную прямую линию в диапазоне концентраций белка 0–10 % (рис. 3). Это является однозначным доказательством существования сферической глобулярной конформации макромолекул альфа-интерферона лейкоцитарного человеческого в водных растворах в изученном диапазоне концентраций. Согласно литературным данным [5] для макромолекул белков, свернутых в сферические глобулы, константа b в уравнении Галлера равна нулю.

Понижение температуры замерзания растворов интерферона альфа лейкоцитарного человеческого линейно зависит от процентной концентрации белка в растворах (таблица 1, рис. 4), аналогично зависимости, выявленной для альбумина [3] и иммуноглобулинов [4].

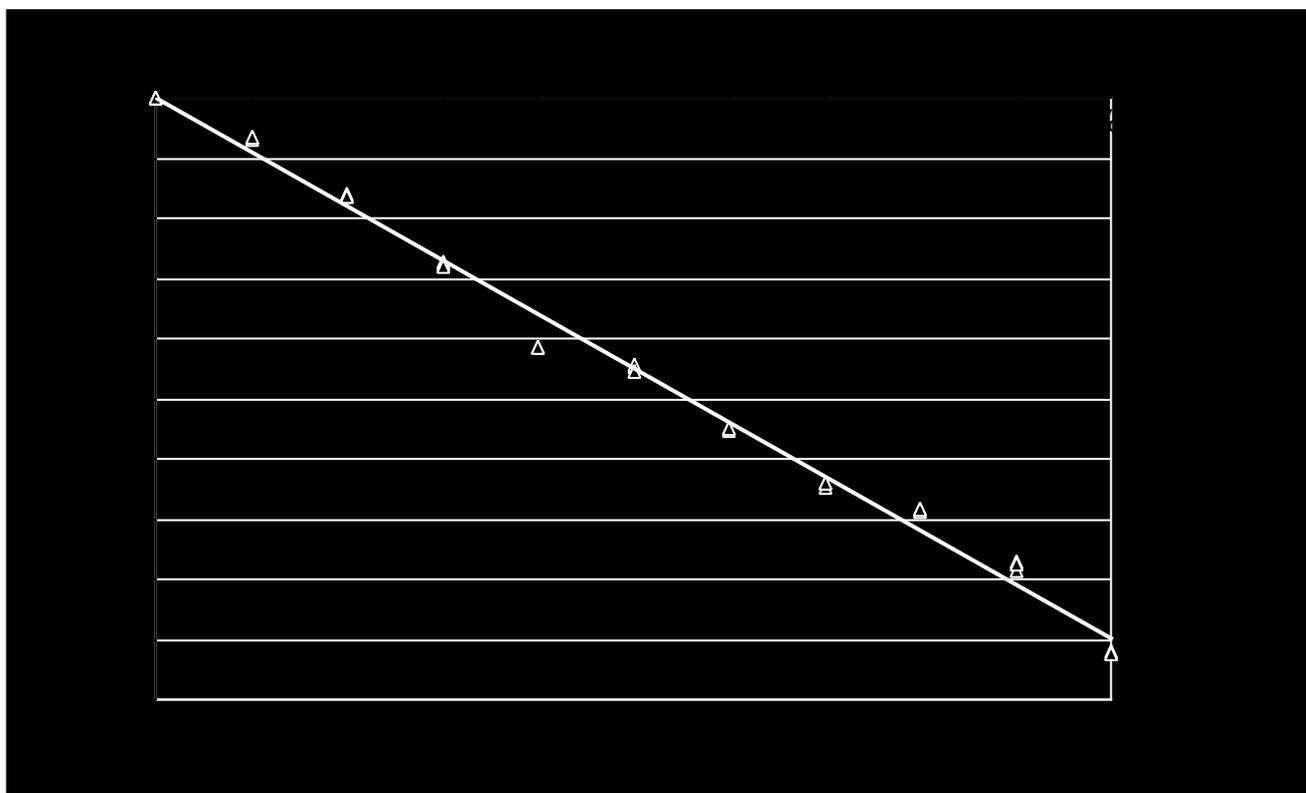


Рис. 4. Зависимость температуры замерзания водных растворов от содержания интерферона альфа лейкоцитарного человеческого

Как следует из полученных данных, значение коэффициента корреляции отвечает критерию приемлемости (не ниже 0,99 по модулю). В этом случае для количественного определения содержания интерферона альфа лейкоцитарного человеческого в водных растворах и контроля качества препаратов может быть использован метод осмометрии.

Таблица 1

Результаты линейного регрессионного анализа зависимости понижения температуры замерзания раствора от концентрации интерферона лейкоцитарного человеческого

Результаты метрологической обработки	Интерферон альфа лейкоцитарный человеческий
Уравнение регрессии вида $y = a + bx$	$\Delta t_{\text{зам}} = -0,18 \cdot C(\%)$
Погрешности в определении параметров a и b	$a \pm \Delta a = -0,001 \pm 0,043 ; (a = 0)$ $b \pm \Delta b = -0,180 \pm 0,007$
Коэффициент корреляции	$R = -0,995$

Растворы альфа-интерферона с концентрацией 10 % не являются изотоничными плазме и крови человека (эффективная осмотическая концентрация составляет около 1982 мОсмоль/кг) в отличие от 10 %-ного раствора альбумина [3].

Выводы

1. При определении содержания интерферона альфа лейкоцитарного человеческого в водных растворах возможно применение криоскопического метода, поскольку доказана линейная зависимость понижения температуры замерзания раствора от процентной концентрации белка, а метод является экспрессным и требующим достаточно малых количеств препарата для определения.
2. Детальное изучение коллигативных свойств водных растворов альфа-интерферона лейкоцитарного человеческого в диапазоне концентраций 0–10 % позволило определить нулевое значение константы в уравнении Галлера и доказать существование только сферической глобулярной конформации белковых макромолекул в исследуемом интервале концентраций.

Список литературы

1. Государственная фармакопея Российской Федерации. XII издание. Ч. I / Изд-во «Научный центр экспертизы средств медицинского применения», 2008. – 704 с.
2. Евсельева Е.А., Симонян Е.В., Миняева О.А. Определение молекулярных параметров и коллигативных свойств водных растворов альбумина // Современные проблемы науки и образования. – 2013. – № 6. – С. 1023.
3. Миняева О.А., Симонян Е.В., Евсельева Е.А., Позднякова Е.С., Музафарова А.Р.,

Саядгалина О.Т. Совершенствование способов контроля качества белка в препаратах иммуноглобулина // Современные проблемы науки и образования. – 2014. – № 1. – С. 364.

4. Степанов В.М. Молекулярная биология, структура и функции белков. – М.: Высшая школа, 1996. – 335 с.

5. Физическая и коллоидная химия: учеб. для фармац. вузов и факультетов / под ред. проф. Беяева А.П. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2008. – 700 с.

6. Шульц Г., Ширмер Р. Принципы структурной организации белков / Под ред. Е.М. Попова. – М.: Мир, 1999. – 355 с.

Рецензенты:

Смолко В.А., д.т.н., профессор, заведующий кафедрой неорганической химии, ФГБОУ ВПО «Южно-Уральский государственный университет» (национальный исследовательский университет), г. Челябинск.

Колесников О.Л., д.м.н., профессор, заведующий кафедрой биологии, ГБОУ ВПО Южно-Уральский государственный медицинский университет, г. Челябинск.