

## ТЕХНИКИ МОЛЕКУЛЯРНОЙ БИОЛОГИИ И КЛЕТОЧНЫХ И ОРГАНОТИПИЧНЫХ КУЛЬТУР В ОЦЕНИВАНИИ ФАРМАКОЛОГИЧЕСКИХ ХАРАКТЕРИСТИК СТАНДАРТИЗОВАННЫХ ФРАКЦИЙ ПРОДУКТОВ ПЧЕЛ

Р. СТОЙКО<sup>1</sup>, Зофия ДЖЕЖЕВИЧЗ, И. СТОЙКО<sup>2</sup>, А. СТОЙКО<sup>2</sup>, Агата ПЫТЕЛ<sup>1</sup>, ПОЛЬША

R. STOJKO<sup>1</sup>, Zofia DZIERŻEWICZ<sup>2</sup>, J. STOJKO<sup>2</sup>, A. STOJKO<sup>2</sup> Agata PYTEL<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Pathology, Faculty of Pharmacy, Medical University of Silesia, Katowice, POLAND, E-mail: rstojko@slam.katowice.pl

<sup>2</sup>Department of Sanitation, Bioanalysis & Environment Research, Faculty of Pharmacy, Medical University of Silesia, Katowice, POLAND

<sup>3</sup>Department of Molecular Biology, Biochemistry and Biopharmacy, Faculty of Pharmacy, Medical University of Silesia, Katowice, POLAND

### Введение

Эволюция медикаментов определена развитием основных наук, а также медицины и технологии. Данные отрасли человеческого знания разрешили и облегчили фармакодинамическое исследование, необходимое для оценивания и фармакологической стандартизации активных веществ, полученных из материалов биогенного происхождения. Наблюдения оказались точкой начала получения синтетических медикаментов. Параллельное развитие биотехнологии, фармакологии и фитохимии привело к значительному прогрессу в том, что касается методов обнаружения, изолирования и анализа ряда веществ, в том числе гликозидов, флавоноидов и алкалоидов. Данные открытия сопровождаются и фармакодинамическими исследованиями, характеризующими биологическую доступность медикамента и устанавливали его фармакологические и токсикологические характеристики. Развитие основных наук, главным образом, молекулярной биологии и генетики способствовало ознакомлению с разными механизмами, которые сопровождают фармакодинамические и фармакокинетические процессы. Их обнаруживание зависело от типа медикамента, от формы и его кондиционирования в организме. Фармакогенетические продукты дали нам ряд случаев, в которых факторы генетические и среды сосуществуют и содействуют.

Недавно проведенные исследования показали, что каждая человеческая порода проявляет иную реакцию к ряду активных веществ, содержащихся в медикаментах. Самые большие различия представляют кавказская и азиатская породы. Известно также, что больные той же породы по-разному реагируют на один и тот же медикамент, в зависимости от возраста, пола, общего состояния здоровья и раньше принятых медикаментов. Имеются доказательства, что гены могут влиять на эффективность разных методов фармакологического лечения. Это потому, что именно гены отвечают за синтез ферментов, которые участвуют в химических реакциях нашего организма. Эти наблюдения частично являются результатами ухода за рядом больных туберкулезом, которых лечили изониазидом. В случае ряда больных применяемый медикамент оставался в крови долгое время. Одни из этих пациентов показывали разного рода нарушения, другие нет. Генетические исследования двух типов, реагирующих на курс лечения, показали два типа наследственного метаболизма к изониазиду, так называемый медленный и быстрый метаболизм.

В последние годы открыты разные типы генов, белковые продукты которых участвуют в процессе химических изменений как ферменты. Вообще врачи не сомневаются в том, что касается типа и дозы того или иного медикамента, когда болезнь вызывается одним геном. Процесс картографии полиморфизма единичного нуклеотида (ПЕН) генома продолжается. Основой фармакогеномики является единственное изменение нуклеотида, наблюдаемое в партиях генов белков, которые перевозят и метаболизируют медикаменты. Когда более чем один ген играет важную роль в той или иной болезни, не очень просто избрать правильную терапию. К сожалению, болезни, вызываемые многими генами, являются самой многочисленной группой болезней. В настоящее время ищут так называемые "горячие точки", то есть, фрагменты ДНК, которые, из-за различий у людей, ответственны за реакцию того или иного организма на тот или иной медикамент. Фармакогеномика, новая отрасль биомедицины, будет исследовать каждого пациента, на основе его ПЕН или "горячих точек" его молекул ДНК.

Фармакодинамика – отрасль, которая будет отвечать за "лечение цель", как показано в известном журнале *American National Human Genome Research Institute* председателем Франсисом Коллинсом. Данная отрасль медицины даст нам много времени и экономию денег, которые мы тратим теперь для лечения. В то же время, такой курс лечения продолжается не так долго и уменьшает эффект побочных явлений медикаментов. Фармакоэпидемиологические данные показывают, без всякого сомнения, нежелательные эффекты рекомендуемых медикаментов. Опубликованные в США доклады показывают, что один человек из четырех умирает из-за вредных эффектов медикаментов. Во Франции, данные показывают, что каждый четвертый медикамент из торговой сети является неэффективным и даже опасным для жизни человека. Мы надеемся, что фармакология будет способна разрабатывать новые медикаменты. Для разработки нового медикамента необходимо знать структуру 3D белков, ферментов, нуклеиновых кислот и рецепторов поверхности клетки. Фармацевтические компании собирают уже пробы ДНК, надеясь таким образом создать профиль

классифицирования пациентов для применения того или иного медикамента. Разработка нового медикамента является долгим процессом, который начинается с исследований в лабораториях. Для большей надежности тесты проводятся в начале на животных и на культурах клеток. В некоторых случаях клинические исследования доказали положительную роль в лечении болезней экспериментальных продуктов, полученных от медоносных пчел.

Биомедицинский прогресс дает нам новые экспериментальные возможности для ознакомления с механизмами, через которые натуральные химические вещества влияют или нет на организм человека. Этим служит пример насекомых, в первую очередь, конечно, пчелиная семья.

В фармакопеи, кроме меда, в первую очередь применяют прополис. Давно известны противобактериальные свойства данного продукта. В настоящее время считают, что бактерицидные эффекты прополиса являются результатом синэргичного эффекта флавоноидов, ароматических кислот и сесквитерпина. Клинические исследования показали его эффекты в случаях ожогов любого типа, струпов, экзем, варикозных язв. Эффективные результаты применения данного продукта в лечении многочисленных болезней показали, что, кроме бактерицидных свойств, прополис способствует и регенерированию тканей. Проведенные исследования показали, что стандартная вытяжка прополиса увеличивает активность фибробластов. Молекулярные же исследования показали, что эффектом прополиса объясняется и повышенная активность переноса генов, участвующих в процессе ангиогенеза. Сравнение клинических исследований с основными позволили нам объяснить механизмы активности продукта на клеточном и молекулярном уровнях. Знание клеточных и молекулярных механизмов активной фракции продуктов пчеловодства в физиологической и патологической системах помогут процессу предупреждения и даже лечения болезней.

Ряд факторов показывает, что жирные кислоты с короткой цепью (ЖККЦ) из толстой кишки играют многие важные физиологические роли. Предполагается, что нарушение их метаболизма может быть одной из причин заболевания толстой кишки. С энергетической точки зрения самой желаемой слизистой оболочкой является бутировая кислота. Демонстрировано, что сокращение ее концентрации в люмене ободочной кишки ведет к атрофированию слизистой оболочки той части пищеварительного тракта. Добавление бутирата регенерирует слизистую оболочку. Предполагают, что бутират мог бы быть важным фактором защиты против рака толстой кишки, так как исследования *in vitro* показали его влияние на раковые клетки. В настоящее время ищут его натуральные источники. Наше внимание привлекает перга, так как литература последних лет показывает, что 14% его содержания представлено органическими кислотами. В нашем институте нами разработан количественный метод определения ЖККЦ в перге. В анализируемой нами перге мы нашли разные ЖККЦ, в том числе бутировую кислоту. Нами отмечено также, что ее засушивание отрицательно влияет на содержание ЖККЦ.

По всей вероятности, шагом вперед изучения эффектов продуктов пчеловодства будет тогда, когда будет возможно использовать первичные культуры и различные типы линий клеток организма человека для анализа их влияния на морфологические и биохимические параметры используемых в культурах клеток. Несомненно, это хорошая альтернатива для исследований на животных, которые, все же, не всегда показывают процессы, развивающиеся в организме человека.

В последние 20 лет развиты новые техники культивирования человеческих клеток и тканей *in vitro*. Возможность получения массы культуры из небольшого фрагмента, прогресс в открытии биологии многих типов клеток привели к повышению интереса для использования в практике этих результатов не только в биологии, но и в медицине. Было отмечено, что клетки здоровой соединительной ткани можно легче культивировать. Были разработаны методы выращивания клеток на основе эпителиальных клеток, например, кератиноцитов кожи, эпителиев почечного тракта, простаты, ротовой полости, вагины и рогаговицы. Кожа очень хорошая ткань для культур, так как более 90% ее содержания входят в одну категорию клеток – кераноцитов. В нормальных условиях кераноциты не утрачивают в культурах способность размножения. Главной причиной неудачных трансплантаций, например, после ожогов, является использование неподходящей кожи. Данный вопрос решен после разработки эквивалента живой кожи (ЭЖК). Экспериментальные данные показали, что экспозиция 2 см<sup>2</sup> ЭЖК химическим факторам вызывает такие же биологические реакции, что и в случае натуральной кожи и что удалены воспаляющие факторы: простагландины E2, простаглицлины, интерлевкины. Очень важно, что при использовании ЭЖК могут быть протестированы твердые, нерастворимые, растворимые вещества, эмульсии и кремы. Могут изучаться также механизмы прилипания микроорганизмов и эффекты медикаментов на эти микроорганизмы. На ЭЖК можно пробовать и новые медикаменты, например, содержащие продукты пчеловодства.

Многие исследователи и врачи придерживаются мнения, что иммунотерапия будет играть все большую роль. Нет никакого сомнения, что продукты пчеловодства положительно влияют на иммунитарную систему нашего организма. Уже давно известно, что прополис и апитоксин сильно стимулируют иммунитарную систему. Осталось нам установить процедуру экспериментальных исследований и ошибки. При использовании фитогемаггутина как митогеничного фактора повышается число лимфоцитов. С этой целью используются два метода – макрокультура и

микрометод. Макрокультура требует 5 – 10 мл крови и культивирования лимфоцитов, изолированных центрифугированием или оседанием. Микрометод состоит в культивировании небольшого числа клеток в 0,3 – 0,5 мл крови.

Классические и современные методы молекулярной биологии позволяют отмечать различия между генами на уровне транскрипции. Гены разных выражений были идентифицированы с помощью дифференциальной или субстративной гибридизации и сепарирования их белковых продуктов. С тех пор, когда нам удалось использовать базу данных нуклеиновых кислот и белковых фрагментов число генов, за выражением которых мы можем следить, превзошло способность традиционных анализов.

Одним из современных подходов к анализам выражения генов, который основывается на технике гибридизации является микропроцессор ДНК. Технология основывается на иммобилизации на субстрате носителя большого числа частиц олигонуклеусов ДНК. Эти частицы имеют роль молекулярных проб, несмотря на то, что не содержат маркеров. Анализируются и маркированы дeoкси- и рибонуклеиновые кислоты. Из-за микроаранжировки ДНК было возможным изучать связывание ДНК и белков. Техники флюоресцентного детектирования позволяют точно идентифицировать каждую составную часть исследованной смеси и количественно оценить ее связывание. Полученные данные обработаны современным методом на компьютере. Данная стратегия позволяет проводить анализ тысяч генов очень быстро. Микронеты ДНК очень популярны для изучения чувствительности к тому или другому медикаменту и для разработки новых медикаментов. В настоящее время эти микронеты стоят очень дорого. Второстепенные возможности микропроцессоров ДНК показаны исследованиями связей между разными веществами и их натурального состава как генетическим материалом, так и регуляторами активности генов в клетках. С тех пор как было показано, что ряд продуктов пчеловодства проявляют в рамках химиотерапии синергичные эффекты, их добавление к медикаментам может способствовать применению меньших доз медикаментов.

#### ЛИТЕРАТУРА

- Pytel A. (2001), Leczenie ran oparzeniowych Propolem-O, Praca doktorska, Śląska Akademia Medyczna, Wydział Farmaceutyczny
- Dzierżewicz Z. et al. (1999), The role of butyric acid in growth, proliferation and differentiation of colonocytes. *Gastroenter. Pol.*, 6, 153-159
- Dzierżewicz Z. et al. (2002), Changes in the cellular behaviour of human colonic cell line Caco2 in response to butyrate treatment. *Acta Biochem. Pol.*, 49, 211-220
- Chodurek E. et al. (2002), Pyrolytic methylation in GC-MS analysis of short-chain fatty acids. *J. Anal. Appl. Pyrolysis*, (in press )
- Gryczka-Suchy R. (2002), Profile krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych w pierzgiach pszczołach. Praca magisterska, Śląska Akademia Medyczna, Wydział Farmaceutyczny
- Marewicz E. (1994), Skin cultures for transplantology and biotechnology. *Post. Biol. Kom.*, 21, (supl.3), 73-87
- Drukała J. (2001), Cell cocultures in skin reconstruction for clinical applications. *Post. biol. kom.* 28,(supl.16) 97-110
- Mirowski M., Bartkowiak J. (2000), DNA microarrays in biomedical studies. *Post. biochem.*, 46, 272-281
- Linkiewicz A., Filipecki M. (2001), From differential gene expression to cDNA clone - a review of methods for identification of genes with variable level of transcription. *Post. biochem.*, 47, 253-263