УДК 578.72: 612.67: 599.323.4: 615.27

ОПРЕДЕЛЕНИЕ БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ПЕПТИДНЫХ БИОРЕГУЛЯТОРОВ В ОРГАНОТИПИЧЕСКОЙ КУЛЬТУРЕ ТКАНЕЙ

[1]Чалисова Н.И., [2]Мельникова Я.В., [1]Заломаева Е.С.

[1]Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН, Санкт-Петербург, e-mail: ni_chalisova@mail.ru;
[2]Самсон-Мед ООО, Санкт-Петербург, e-mail: IVMelnikova@if-capital.ru

Методом органотипического культивирования тканей проведен анализ биологической активности биорегуляторных пептидов лекарственных препаратов «Сампрост®», «Простакор®», применяющихся для лечения патологии предстательной железы, и лекарственных препаратов «Тималин», «Тактивин®», использующихся для лечения заболеваний иммунной системы. Используемые для анализа метод реактивации щелочной фосфатазы, ингибированной цистеином, и метод «активного розеткообразования» тимоцитов морской свинки с эритроцитами кролика отражают каждый лишь один из многих биохимических процессов в организме. Преимуществом метода органотипического культивирования является то, что в эксплантатах сохраняется та же соподчиненность клеточного состава ткани, как и в целостном организме. Вследствие этого становится возможным выявление действия пептидов на основной клеточный процесс – пролиферацию – в соответствующей ткани. Это позволяет провести быструю скрининговую количественную оценку активности и специфичности действия исследуемых биорегуляторных пептидов.

Ключевые слова: пептидные биорегуляторы, органотипическая культура ткани, клеточная пролиферация

DETECTION OF BIOLOGICAL ACTIVITY OF BIOREGULATORY PEPTIDES IN ORGANOTYPIC TISSUE CULTURE

[1]Chalisova N.I., [2]Melnikova Ya.V., [1]Zalomaeva E.S.

[1]Pavlov Institute of Physiology RAS, St. Petersburg, e-mail: ni_chalisova@mail.ru;
[2]Samson-Med OOO, St. Petersburg, e-mail: IVMelnikova@if-capital.ru

Bioactivity of bioregulatory peptides «Samprost®», «Prostacor®», that are used for treating prostate pathology, and «Thymalin», «Tactivin®», that are used for treating immune system pathology, was analyzed using an organotypic culture method. The common methods of the alcaline phosphatase reactivation and test of rosette formation by guinea pig thymocytes and thymus derived lymphocytes with rabbit red blood cells present only one of many biochemical processes in organism. The advantage of the organotypic culture method is that the explants keep the same cellular hierarchy in the tissue, as it is in the organism. So the determination of the peptide effect on the basic cellular process such as proliferation is possible in the relevant tissue. This helps to make rapid screening evaluation of the peptide bioactivity.

Keywords: bioregulatory peptides, organotypic tissue culture, cellular proliferation

Для исследования биологически активных веществ (БАВ), одним из наиболее удобных и быстрых методов является методика органотипического культивирования различных тканей [9, 10]. С применением этой методики был исследован ряд биорегуляторных пептидов, не обладающих видоспецифичностью, в но в то же время являющихся тканеспецифичными [6, 7]. Биорегуляторные пептиды в настоящее время уже используются в медицинской практике при многих заболеваниях нервной, иммунной, эндокринной систем, при патологии различных органов [3, 9]. Одним из научно обоснованных методов повышения продолжительности и качества жизни также является применение пептидных биорегуляторов. Пептидные биорегуляторные препараты в течение 1980–2015 гг. получили более 15 млн человек с различной патологией или в качестве средств профилактики, и в рандомизированном сравнительном исследовании установлено снижение темпа старения организма и смертности [9].

В настоящее время фармацевтическая компания ООО «Самсон-Мед» производит субстанцию и лекарственный препарат «Сампрост® лиофилизат для приготовления раствора для внутримышечного введения 5 мг», который представляет собой комплекс биологически активных пептидов предстательной железы, а ФГУП «НПО «Микроген» производит лекарственный препарат «Простакор раствор для внутримышечного введения, 5 мг/мл». Препараты получают из предстательной железы крупного рогатого скота и используют для лечения простатита. «Тималин лиофилизат для приготовления раствора для внутримышечного введения» производства ООО «Самсон-Мед» и «Тактивин® раствор для подкожного введения 0,1 мг/мл» производства АО «Биомед» им. И.И. Мечникова являются иммуномодулирующими препаратами, их получают из тканей тимуса (вилочковой железы) крупного рогатого скота. Актуальной является проблема быстрого тестирования биологической активности и специфичности

действия этих препаратов. Метод реактивации щелочной фосфатазы, ингибированной цистеином, а также метод «активного розеткообразования» тимоцитов морской свинки с эритроцитами кролика отражают каждый только один из многих биохимических процессов в организме. В то же время органотипическое культивирование сразу показывает воздействие пептидов на основные клеточные процессы – пролиферацию или апоптоз (программированная клеточная гибель) в соответствующей ткани. Т.е. при культивировании максимально воспроизводятся те условия, которые происходят в тканях организма под действием биорегуляторных пептидов, с учетом усиления клеточной регенерации. Таким образом, наиболее адекватным методом для быстрой количественной оценки направленности влияния исследуемых БАВ является органотипическое культивирование фрагментов тканей [1, 2, 7, 8]. Этот быстрый (в течение 3 суток) скрининговый метод позволяет проанализировать усиление или угнетение клеточной регенерации при воздействии того или иного биологически активного вещества, а также лекарственного препарата. К преимуществам этого метода относится также то, что в фрагментах культивируемой ткани сохраняется ее структурная организация.

Целью работы было исследование биологической активности и специфичности действия вышеуказанных препаратов с использованием метода органотипического культивирования различных тканей крыс.

Материалы и методы исследования

В опытах органотипического культивирования использованы половозрелые крысы линии Вистар, массой 250–300 г. Фрагменты селезенки либо предстательной железы самцов крыс величиной 1 мм^3 размещались в чашках Петри (с полилизиновым покрытием дна). В питательную среду добавляли по 35% среды Игла и раствора Хенкса, а также фетальную сыворотку быка, глюкозу (0,6%), гентамицин (100ед/мл). Для определения эффективных концентраций лекарственные препараты добавляли в питательную среду экспериментальных чашек Петри в концентрациях 1–50 нг/мл. Эксплантаты тканей в чашках Петри культивировались в термостате с подачей 5% CO_2. при температуре 37°С. В 1-е сутки культивирования происходило выселение пролиферирующих и мигрирующих клеток, образующих зону роста эксплантата. Оценку влияния препаратов на развитие эксплантатов производили морфометрическим методом, используя критерий индекса площади (ИП). ИП являлся отношение площади всего эксплантата, вместе с периферической зоной роста, к площади центральной зоны. В каждой чашке Петри считали ИП у каждого из 15–18 эксплантатов, складывали значения и делили на число эксплантатов, т.е. получали средний ИП для данной чашки. Контрольное значение ИП принимали за 100%, все остальные ИП выражали в процентах к контролю. Достоверность различий сравниваемых средних значений ИП контрольных и опытных образцов оценивали с помощью t-критерия Стьюдента. Статистическую обработку полученных данных производили с использованием пакета программ «Microsoft Excel».

Результаты исследования и их обсуждение

В табл. 1 представлены результаты тестирования влияния ряда биорегуляторных пептидов, выделенных из предстательной железы крупного рогатого скота, на увеличение индекса площади (%) эксплантатов предстательной железы линейных крыс Вистар. Так при культивировании фрагментов ткани выявлено, что лекарственный препарат «Сампрост® лиофилизат» серии 10214 в концентрациях 20 и 50 нг/мл приводил к статистически достоверному увеличению ИП эксплантатов на 22 ± 3% ($n = 21$, $p < 0,05$) и на 47 ± 5% ($n = 19$, $p < 0,05$) соответственно, по сравнению с ИП контрольных эксплантатов ($n = 18$). Препарат «Простакор®» приводил к статистически достоверному увеличению ИП эксплантатов на 20 ± 3% ($n = 20$, $p < 0,05$), по сравнению с ИП контрольных эксплантатов ($n = 19$) только при концентрации 50 нг/мл. Таким образом, препарат Сампрост обладал более широким диапазоном действия, эффективно стимулируя зону роста предстательной железы при концентрациях 20 и 50 нг/мл.

В табл. 2 представлены результаты тестирования влияния ряда биорегуляторных пептидов, выделенных из вилочковой железы крупного рогатого скота, на увеличение индекса площади (%) эксплантатов на иммунную ткань селезенки линейных крыс Вистар. При культивировании фрагментов ткани выявлено, что препарат Тималин серии 14 в концентрации 50 нг/мл к статистически достоверному увеличению ИП эксплантатов на 35 ± 5% ($n = 20$, $p < 0,05$) соответственно, по сравнению с ИП контрольных эксплантатов ($n = 21$). Препарат Тактивин приводил к увеличению ИП эксплантатов лишь на 20 ± 1% ($n = 18$, $p < 0,05$), по сравнению с ИП контрольных эксплантатов ($n = 19$) при концентрации 50 нг/мл.

В следующих сериях опытов для выявления тканеспецифического действия биорегуляторных пептидов использовался пептидный препарат Кортексин, обладающий тропностью к тканям нервной системы [3, 4]. Эксперименты заключались в том, что, например, Тималин серии 121016 в эффективной концентрации вводился в чашки Петри с эксплантатами селезенки и в дру-

гие чашки с эксплантатами коры головного мозга крыс. Аналогичным образом вводился Кортексин в эффективных концентрациях как в чашки с эксплантатами коры, так и в чашки с эксплантатами селезенки. Найдено, что Тималин 121016 увеличивал ИП эксплантатов селезенки на 27 ± 5 % (n = 18, p < 0,05), по сравнению с ИП контрольных эксплантатов (n = 20) и не оказывал влияния на эксплантаты коры головного мозга – ИП оставался на уровне контроля (табл. 3). В то же время Кортексин увеличивал значения ИП эксплантатов коры головного мозга на 20 ± 3 % (n = 17, p < 0,05), по сравнению с ИП контрольных эксплантатов (n = 18), а при действии на эксплантаты селезенки значения ИП оставались на уровне контрольных эксплантатов.

Таблица 1

Влияние биорегуляторных пептидов на увеличение индекса площади (%) эксплантатов предстательной железы

Наименование препарата	Номер серии	Производитель	Концентрация препарата	
			20 нг/мл	50 нг/мл
«Сампрост® лиофилизат для приготовления раствора для внутримышечного введения 5 мг»	90116 (производственная серия лиофилизата)	ООО «Самсон-Мед»	20*	22*
	10214 (производственная серия лиофилизата)		22*	47*
	940816 (производственная серия лиофилизата)		24*	22*
«Простакор раствор для внутримышечного введения, 5мг/мл»	УП 10616	Микроген НПО	5	20*

Примечание. * p < 0,05 по сравнению с показателем в контроле.

Таблица 2

Влияние биорегуляторных пептидов на увеличение индекса площади (%) эксплантатов селезенки

Наименование препарата	Номер серии	Производитель	Концентрация препарата	
			20 нг/мл	50 нг/мл
«Тималин лиофилизат для приготовления раствора для внутримышечного введения»	14 (опытный лиофилизат, соответствует условиям производства)	ООО «Самсон-Мед»	12	35*
	121016 (производственная серия лиофилизата,)		22*	19
«Тактивин® раствор для подкожного введения 0,1 мг/мл»	0110117	АО «Биомед» им. И.И. Мечникова	4	20*

Примечание. * p < 0,05 по сравнению с показателем в контроле.

Таблица 3

Индекс площади (%) при действии эффективных концентраций Тималина серии 21 (50 нг / мл) и Кортексина (20нг / мл) на эксплантаты селезенки и коры головного мозга

Наименование ткани	Наименование препарата	
	Тималин, серия 121016	Кортексин
Селезенка	22*	-4
Кора головного мозга	5	20*

Примечание. * p < 0,05 по сравнению с показателем в контроле.

Аналогичным образом подтверждено тканеспецифическое действие остальных исследованных биорегуляторных пептидов в отношении тканей предстательной железы и селезенки. Таким образом, используемый для идентификации и характеристики биорегуляторных пептидов скрининговый метод органотипического культивирования тканей относительно прост и позволяет быстро получить экспериментальные данные, необходимые для статистической обработки. Можно полагать, что метод органотипического культивирования тканей для определения активности биорегуляторных пептидов имеет ряд преимуществ по сравнению с такими методами, как реакция «активного» розеткообразования (РОК) для исследования препаратов из тимуса или реактивация щелочной фосфатазы, ингибированной цистеином, для исследования препаратов из предстательной железы. Указанные методы представляют многоступенчатые трудоемкие исследования с использованием большого количества химических реактивов. Для метода РОК требуется значительное количество дорогостоящих животных – морских свинок. Данные, полученные в настоящей работе методом органотипического культивирования тканей свидетельствуют о биологической активности и специфичности действия препаратов «Сампрост®», «Простакор®», «Тималин», «Тактивин®». Биологическая активность биорегуляторных пептидов может быть объяснена на молекулярном уровне следующим образом [7, 8]. Олигопептиды способны проникать в клетку через цитоплазму и мембрану ядра [5]. Комплементарное взаимодействие этих пептидов с промоторными зонами генов является сигналом для транскрипции, трансляции и синтеза белков на рибосомах. Цепь этих процессов приводит к повышению функций различных органов и увеличивает ресурс организма.

Заключение

Полученные в данной работе результаты показывают, что использование органотипической культуры ткани, представляющей сравнительно простую модельную систему, позволяет быстро тестировать биологическую активность и специфичность действия биорегуляторных пептидов. Это в свою очередь способствует успешному решению многих проблем фармакологии в области биорегуляторных пептидов.

Список литературы

1. Вахитов Т.Я., Чалисова Н.И., Полевая Е.В., Линькова Н.С., Салль Т.С. Хавинсон В.Х. Сравнительное изучение регуляторного действия карбоновых кислот и аминокислот в органотипической культуре ткани селезенки // Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. – 2016. – № 4–2. – С. 362–364.

2. Рыжак А.П., Чалисова Н.И., Линькова Н.С., Ничик Т.Е., Дудков А.В., Колчина Н.В., Рыжак Г.И., Халимов Р.И. Влияние полипептидов на пролиферацию и апоптоз клеток при старении // Клеточные технологии в биологии и медицине. – 2016. – № 4. – С. 223–225.

3. Рыжак Г. А., Малинин В. В., Платонова Т. Н. Кортексин и регуляция функций головного мозга. – СПб.: Фолиант, 2003. – С. 94–234.

4. Умнов Р.С., Линькова Н.С., Хавинсон В.Х. Нейропротекторные эффекты пептидных биорегуляторов у людей разного возраста: обзор литературы // Успехи геронтологии. – 2013. – Т. 26, № 4. – С. 671–678.

5. Федореева Л.И, Киреев И.И., Хавинсон В.Х., Ванюшин Б.Ф. Проникновение коротких флуоресцентно-меченых пептидов в ядро в клетках HeLa и специфическое взаимодействие пептидов с дезоксирибоолигонуклеотидами и ДНК in vitro // иохимия. – 2011. – Т. 76. – С. 1505–1516.

6. Хавинсон В.Х., Чалисова Н.И., Линькова Н.С., Халимов Р.И., Ничик Т.Е. Зависимость тканеспецифического действия пептидов от количества аминокислот, входящих в их состав. // Фундаментальные исследования. – 2015. – № 2, часть 3. – С. 497–503.

7. Чалисова Н.И., Рыжак А.П, Линькова Н.С., Рыжак Г.А., Жекалов А.Н. Влияние полипептидов на регенерацию клеток в культуре разных тканей молодых и старых крыс. // Успехи геронтологии. – 2015. – Т. 28, № 1. – С. 93–107.

8. Чалисова Н.И., Червякова Н.А., Линькова Н.С., Концевая Е.А., Трофимова С.В., Хавинсон В.Х. Молекулярные аспекты иммунопротекторного действия пептидов в селезенке при ее старении // Успехи геронтологии. – 2013. – Т. 26. № 2. – С. 224–228.

9. Хавинсон В.Х., Кузник Б.И., Рыжак Г.А. Пептидные регуляторы – новый класс геропротекторов. Сообщение 2. Результаты клинических исследований // Успехи геронтологии. – 2013. – Т. 26, № 1. – С. 20–37.

10. Хавинсон В.Х., Чалисова Н.И., Малинин В.В., Григорьев Е.И. Тканеспецифическое действие пептидов в культуре тканей крыс разного возраста // Успехи геронтологии. – 2002. – Т. 10, № 9. – С. 95–100.