

УДК 591.1:612.67

ОЛИГОПЕПТИДЫ СТИМУЛИРУЮТ КЛЕТочНУЮ ПРОЛИФЕРАЦИЮ В КУЛЬТУРЕ ТКАНИ ПЕЧЕНИ КРЫС

¹Чалисова Н.И., ²Заломаева Е.С.

¹Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН, Санкт-Петербург, e-mail: ni_chalisova@mail.ru;

²АНО НИЦ «Санкт-Петербургский институт биорегуляции и геронтологии», Санкт-Петербург, e-mail: kostikorange@yandex.ru

В работе исследовано влияние трипептида Т-1 (состав: глутаминовая кислота, аспарагиновая кислота и лейцин) и тетрапептида Т-2 (состав: лизин, глутаминовая кислота, аспарагиновая кислота и аланин) на развитие эксплантатов печени молодых половозрелых крыс в органотипической культуре ткани. Эти олигопептиды в диапазоне концентраций 10^{-10} – 10^{-12} М оказывали стимулирующее действие на клеточную пролиферацию эксплантатов. При этом наблюдали увеличение индекса площади (отношение зоны роста ко всей площади эксплантата) на 24-33%, по сравнению с контролем. Трипептид Т-1 оказывал стимулирующее влияние на пролиферацию клеток в более широком диапазоне концентраций, по сравнению с тетрапептидом Т-2. В связи с тем, что глутаминовая кислота обладает стимулирующим действием на клеточную пролиферацию эксплантатов ткани печени, а угнетающее действие оказывают аспарагиновая кислота, лизин и лейцин, то совместное действие этих аминокислот в составе олигопептидов создает баланс, необходимый для поддержания основных клеточных функций – пролиферации и апоптоза, что в свою очередь благоприятствует запуску регенерационных процессов в ткани печени. Таким образом исследованные олигопептиды способны усиливать регенерационные процессы в ткани печени. Исследованные олигопептиды, эффективные в ультрамалых дозах, создают базу для разработки на их основе препаратов с уменьшенной выраженностью побочных эффектов для профилактики и лечения заболеваний печени.

Ключевые слова: олигопептид, печень, органотипическая культура ткани

OLIGOPEPTIDES STIMULATE THE CELLULAR PROLIFERATION IN THE LIVER TISSUE CULTURE IN RATS

¹Chalisova N.I., ²Zalomaeva E.S.

¹Pavlov Institute of Physiology of Russian Academy of Sciences, Sankt-Petersburg, e-mail: ni_chalisova@mail.ru;

²Sankt-Petersburg Institute of bioregulation and gerontology, Sankt-Petersburg, e-mail: kostikorange@yandex.ru

It was shown the effect of the tripeptide T-1 (Glutamine acid, Asparagine acid, Leucine) and tetrapeptide T-2 (Lysine, Glutamine acid, Asparagine acid, Alanine) on the organotypic tissue culture development in rats. If these oligopeptides have the stimulating effect, at 10^{-10} – 10^{-12} M concentration diapason, on the cellular proliferation in the explants and a square area was increased by 24-33%, as compared to the control explants. The tripeptide T-1 was effective in the greater concentration diapason, compared to the tetrapeptide T-2, these oligopeptides can increase the regeneration processes in the liver tissue. If the Glutamine acid can stimulate the cellular proliferation in the liver explants, and Asparagine acid, Leucine and Lysin inhibit, the synchronous effect of these amino acids lead to this balance of proliferation and apoptosis processes, which is necessary for the regeneration of the liver tissue. The oligopeptides investigated, effective at the ultrasmall doses, create the base for the synthesis of the preparations with little side effect for the prophylactic and treatment of the liver pathology.

Keywords: oligopeptide, liver, organotypic tissue culture

Печень, являясь железой внешней секреции человека и позвоночных животных, выполняет большое количество различных жизненно важных физиологических функций. В печени происходит обезвреживание различных токсических и аллергических веществ, которые превращаются в значительно более легко удаляемые из организма вещества. Кроме того, функциональная роль печени заключается в удалении избытков гормонов, витаминов, промежуточных и конечных продуктов обмена ряда веществ. Кроме выполнения барьерной функции клетки печени синтезируют белки, мочевины, желчные кислоты, триглицериды. Важную роль печень играет в процессах

глюкогенеза. В печени образуется множество различных веществ, необходимых для энергетического и пластического обмена организма. К ним относятся аминокислоты, моносахариды, жирные кислоты, а также многие другие химические соединения. Печень участвует в сохранении равновесия жидкостей в организме, обеспечивает поступление в кровь фосфатидов и белков, а также оказывает влияние на поддержание постоянной концентрации питательных веществ в крови. Печень выделяет с желчью чужеродные вещества, продукты порфиринового обмена, желчные кислоты и холестерин. Таким образом, печень выполняет много жизненно важных функций, и любые

патологии, приводящие к их нарушениям, будут оказывать пагубное влияние на организм в целом.

Одной из актуальных проблем современной медицины и биологии является проблема профилактики и лечения патологических состояний печени. В течение всей жизни человек оказывает очень высокие нагрузки на печень, заставляя её работать в режиме перегрузки. На состоянии печени неизбежно сказываются неправильное питание, стрессы, алкоголь, курение, а также лекарства, которые человек за свою жизнь принимает в избытке. Многие заболевания других органов и тканей также отрицательно сказываются на состоянии печени. Согласно данным Всемирной организации здравоохранения, во всем мире наблюдается отчетливая тенденция к росту заболеваний печени в последние 20 лет. Продолжительное воздействие перегрузок на печень приводит к разрушению клеточных мембран и органелл, что способствует проявлению нарушений жизнедеятельности клеток.

В организме функцию регуляции роста и развития клеток, а также процессов их пролиферации, дифференцировки и апоптоза выполняет ряд биорегуляторов. В настоящее время исследование различных цитокинов и биорегуляторных пептидов создают основу для разработки новых препаратов для профилактики и лечения ряда заболеваний печени. В ряде работ [1–3] установлена перспективность использования олигопептидов в качестве потенциальных лекарственных средств, увеличивающих регенерационный потенциал тканей организма.

Для тестирования биологической активности различных веществ одним из наиболее адекватных методов является их апробация в органотипической культуре ткани [4–6]. Данный метод удобен отсутствием в культуре гуморальных и нервных влияний, которые действуют на клетки в целостном организме. Ткань находится в стандартных, контролируемых условиях, причем возможно строгое дозирование вводимого в культуру ткани вещества.

Цель работы: исследование влияния синтезированных трипептида и тетрапептида на пролиферацию клеток в органотипической культуре ткани печени молодых половозрелых крыс.

Материалы и методы исследования

Работу проводили на крысах линии Вистар из биокolleкции «Коллекция лабораторных млекопитающих разной таксономической принадлежности» Института физиологии им. И.П. Павлова РАН, под-

держанной программой биоресурсных коллекций ФАНО России. В экспериментах использовано 850 эксплантатов печени половозрелых крыс массой 200–250 г.

Исследованы разработанные в Санкт-Петербургском Институте биорегуляции и геронтологии олигопептид Т-1 (состоит из 3-х аминокислот: глутаминовая кислота, аспарагиновая кислота, лейцин) и олигопептид Т-2 (состоит из 4-х аминокислот: лизин, глутаминовая кислота, аспарагиновая кислота, аланин).

Фрагменты печени величиной около 1 мм³ помещают в чашки Петри. Наличие полилизинового покрытия на дне чашки способствует лучшему прикреплению эксплантатов. Вся работа проводится в стерильном ламинаре при наличии потока стерильного воздуха. Для жизнедеятельности клеток необходимо наличие питательной среды (состав: 35% среды Игла, 35% раствора Хенкса, 5% фетальной сыворотки быка, 0,6% глюкозы, 100 ед/мл гентамицина). Олигопептиды были добавлены в чашки Петри в концентрациях от 0,01 нг/мл до 10 нг/мл. Трое суток чашки Петри с эксплантатами находились в термостате с подачей 5% CO₂ при температуре 37°C. В первые сутки культивирования происходила пролиферация и мигрирование гепатоцитов, образующих периферическую зону роста эксплантатов. Через трое суток с использованием фазово-контрастного микроскопа морфометрическим методом оценивали влияние олигопептидов на развитие эксплантатов печени. Рассчитывали индекс площади (ИП) эксплантатов (отношение площади всего эксплантата, совместно с периферической зоной роста (A₂), к площади центральной зоны эксплантата (A₁) по формуле $\Delta\% = ((A_2 - A_1)/A_1) \times 100\%$. Контрольное значение ИП принимали за 100%, все остальные ИП выражали в процентах к контролю. Достоверность различий ИП в контроле и эксперименте оценивали с помощью t-критерия Стьюдента. Статистическую обработку полученных данных производили с использованием пакета программ «Microsoft Excel».

Результаты исследования и их обсуждение

При исследовании трипептида Т-1 в концентрациях от 0,01 до 10 нг/мл выявлялась его эффективная концентрация.

Как показано на рис. 1, препарат оказывает статистически достоверное стимулирующее влияние на Индекс площади эксплантатов ткани печени молодых крыс в концентрации 0,05 нг/мл (ИП выше на 33,0% (p < 0,05) по сравнению с контро-

лем), в концентрации 0,1 нг/мл (ИП выше на 30,1 % ($p < 0,05$) по сравнению с контролем), в концентрации 1 нг/мл (ИП выше на 20,1 % ($p < 0,05$) по сравнению с контролем) и в концентрации 10 нг/мл (ИП выше на 24,3 % ($p < 0,05$) по сравнению с контро-

лем). В концентрации 0,01 нг/мл препарат достоверно стимулирующего или угнетающего действия не оказывал.

При раститровке тетрапептида Т-2 в концентрациях от 0,01 до 10 нг/мл выявлялась его эффективная концентрация.

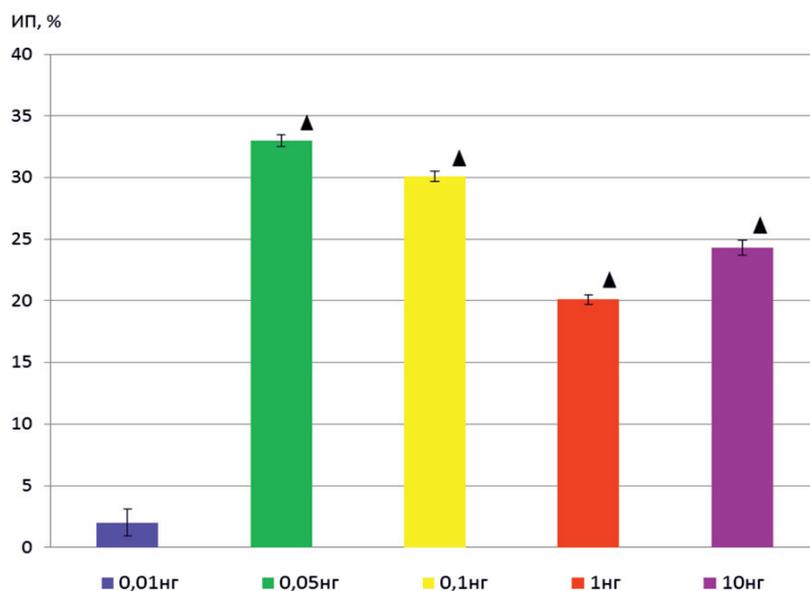


Рис. 1. ИП (%) эксплантатов ткани печени, в питательную среду которых был добавлен трипептид Т-1, по сравнению с контрольными эксплантатами. Примечание: контроль – нулевая линия. ▲ $p < 0,05$ по сравнению с контролем

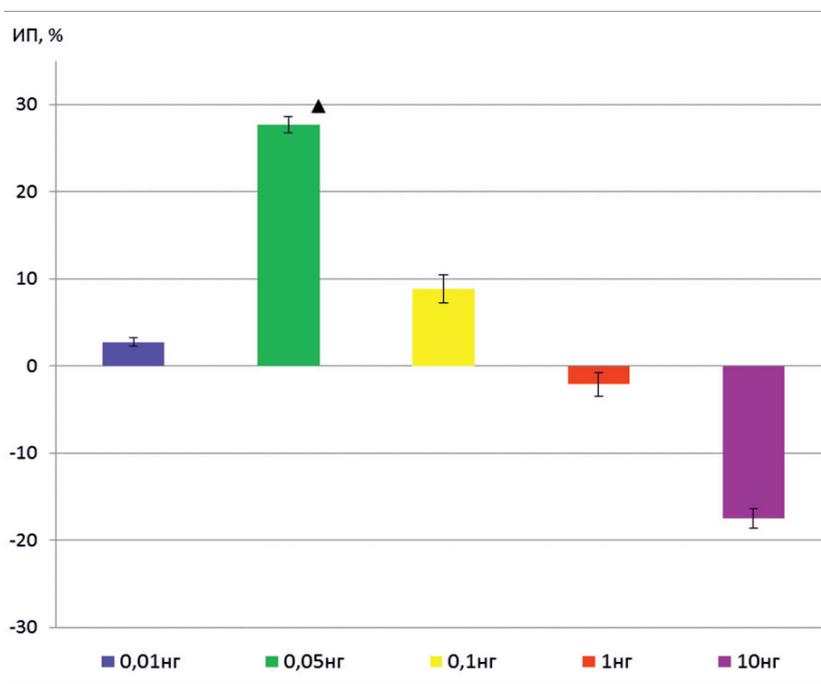


Рис. 2. ИП (%) эксплантатов ткани печени, в питательную среду которых был добавлен тетрапептид Т-2, по сравнению с контрольными эксплантатами. Примечание: контроль – нулевая линия. ▲ $p < 0,05$ по сравнению с контролем

Как показано на рис. 2, препарат Т-2 в концентрации 0,05 нг/мл оказывает статистически достоверное стимулирующее влияние на ИП эксплантатов ткани печени молодых крыс (ИП выше на 27,7% ($p < 0,05$) по сравнению с контролем). В концентрациях 0,01 нг/мл, 0,1 нг/мл, 1 нг/мл и 10 нг/мл препарат статистически достоверного стимулирующего или угнетающего действия не оказывал.

Таким образом, в результате эксперимента было выявлено, что исследованные олигопептиды оказывают стимулирующее клеточную регенерацию влияние на ткань печени крыс. Более широкий диапазон стимулирующих пролиферацию концентраций был у трипептида Т-1, по сравнению с тетрапептидом Т-2.

Использованные в наших экспериментах олигопептиды состоят из ряда аминокислот, у которых, как показано в ряде исследований [7–9], наблюдаются либо стимулирующий, либо угнетающий клеточную пролиферацию тканей эффекты. Так стимулирующим статистически достоверным влиянием на ИП эксплантатов ткани печени крыс обладала глутаминовая кислота (ИП повышался на 26%, по сравнению с контролем), а угнетающее действие на ИП эксплантатов ткани печени было выявлено у аспарагиновой кислоты, лизина и лейцина. Совместное действие в составе олигопептидов стимулирующей и угнетающей аминокислот создает баланс, необходимый для поддержания основных клеточных функций – пролиферации и апоптоза, что в свою очередь способствует запуску регенерационных процессов в ткани печени.

В настоящее время складывается концепция, что на клеточном уровне регуляция поддержания функциональной активности организма осуществляется сигнальными молекулами, в том числе пептидами, способствующими сохранению сложного равновесия между такими физиологическими клеточными процессами, как пролиферация, дифференцировка и апоптоз [10–13]. Регуляцию межклеточных сигналов на аутокринном и паракринном уровнях выполняют специальные сигнальные молекулы – цитомины и цитокины. Постоянный процесс обмена веществ, а также воспроизведения генетической информации происходит в живых организмах именно с помощью различных регуляторных факторов. Изучение и выявление таких факторов в многоклеточных системах позволяет выявить генез развития организмов, а также процессы клеточной дифференцировки. В настоящее время формируется концепция о том, что подобные регуляторные механизмы возникли в эволю-

ции в результате не только стимулирующих, но и угнетающих биохимических реакций. Как показывают результаты, полученные в данной работе, именно сочетание в олигопептидах стимулирующих аминокислот с ингибирующими приводит к эффективному воздействию таких олигопептидов на регенерационные процессы в ткани печени. Подобные сочетания выполняют роль регуляторных механизмов, координирующих соотношение гепатоцитов, фибробластов и, в результате, контролируют пролиферационные процессы в ткани печени.

Таким образом, можно сделать вывод, что олигопептиды образуют систему сигнальных молекул, обеспечивающую регуляцию функций организма на различных уровнях (молекулярно-генетическом, клеточном, субклеточном и тканевом). Выявлено, что исследованные в данной работе олигопептиды регулируют экспрессию генов и синтез белков [1, 3], а также стимулируют пролиферацию клеток ткани печени. Это чрезвычайно важно для восстановления функций исследуемого органа при наличии у него различных патологий. Поэтому на основе данных пептидов возможно создание базы для новых подходов к профилактике и лечению заболеваний печени.

Известно, что для лечения заболеваний печени, а также нарушений функций печени, связанных со старением организма, в настоящее время используют также препараты полипептидных комплексов (ППК). Данные пептидные препараты показали статистически значимый клинический эффект и начали применяться в клинической практике [13]. Однако олигопептиды, в производстве которых используется химический синтез, позволяют отказаться от трудоемкого и дорогого экстрагирования ППК из тканей крупного рогатого скота. Препараты на основе коротких аминокислотных цепочек являются инновационным подходом к лечению и профилактике различных нарушений печени. При их создании необходимо учитывать ранговое количество аминокислот, входящих в ППК, и влияние отдельных аминокислот на данную ткань. Эти условия были соблюдены при синтезе трипептида Т-1 и тетрапептида Т-2, в состав которых входят аминокислоты как стимулирующие пролиферацию клеток ткани печени, так и ингибирующие клеточную пролиферацию.

Следует отметить, что эффективные концентрации исследованных олигопептидов находились в диапазоне ультрамалых концентраций ($10^{-10} - 10^{-12}M$). В последние десятилетия уделяется значительное внимание проблеме чувствительности животных и человека к ультрамалым концентрациям биологически

активных веществ. Такая чувствительность получила обозначение нано- или пикограммовой чувствительности (10^{-12} М и ниже), что составляет 0,01–0,05 нг/мл. Влияние ультрамалых доз уже продемонстрировано на биологических моделях разного рода – изолированных ферментах, клетках, тканях, лабораторных животных, и даже в клинических исследованиях [12–14]. Причем эффект ультрамалых доз развивается даже несмотря на присутствие эндогенных веществ в превышающих концентрациях в тестируемой биологической системе, что свидетельствует о важности не столько количества самого вещества, но о происходящем концентрационном сдвиге. В связи с этим можно полагать, что олигопептиды, эффективные в ультрамалых дозах, создают базу для разработки на их основе таких лекарственных препаратов, у которых, по сравнению с другими препаратами, будет значительно уменьшена выраженность побочных эффектов. Синтезированные олигопептиды, при введении их в состав лекарственных препаратов, будут способствовать развитию регенерационных процессов в ткани печени, что является существенным фактором при профилактике и лечении заболеваний печени.

Заключение

Полученные результаты исследования олигопептидов Т-1 и Т-2 открывают широкие перспективы для дальнейшего их изучения на организменном уровне с целью разработки в будущем лекарственных препаратов для лечения и профилактики различных патологий печени.

Список литературы

1. Хавинсон В.Х., Анисимов В.Н. Пептидная регуляция старения: 35-летний опыт исследований // Бюл. эксперим. биол. и мед. 2009. № 7. С. 108–113.

2. Ammerpohl O., Pratschke J., Schafmayer C. Distinct DNA methylation patterns in cirrhotic liver and hepatocellular carcinoma. *Int. J. Cancer*. 2011. vol. 130. P. 1319–1328.

3. Khavinson V.Kh., Tendler S.M., Kasyanenko N.A. Tetrapeptide KEDW Interacts with DNA and Regulates Gene Expression. *Am. Journal Biomed. Sci.* 2015. vol. 7. no 3. P. 156–169.

4. Чалисова Н.И., Смирнов В.А. Влияние сочетаний аминокислот на органотипическую культуру миокарда // Бюл. эксп. биол. мед. 2011. № 4. С. 445–449.

5. Хавинсон В.Х., Линькова Н.С., Дудков А.В., Полякова В.О., Кветной И.М. Пептидергическая регуляция экспрессии генов, кодирующих антиоксидантные и противовоспалительные белки // Бюл. эксп. биол. мед. 2011. № 11. С. 548–551.

6. Чалисова Н.И., Концевая Е.А., Войцеховская М.А. Регуляторное влияние кодируемых аминокислот на основные клеточные процессы у молодых и старых животных // Успехи геронтологии. 2011. № 2. С. 189–197.

7. Kimball S.R., Jefferson L.S. New functions for amino acids: effects on gene transcription and translation. *Am. J. Clin. Nutr.* 2006. vol. 83. no 2. P. 500–507.

8. Chalisova N.I., Zakutskii A. Effect of amino acids on cell proliferation and P53 expression in neonatal rats. *Cell Biol. Int.* 2008. vol. 32. no 2. P. 1574–157.

9. Booth P.J., Humpherson P.G., Watson T.J. Amino acid depletion and appearance during porcine preimplantation embryo development in vitro. *Reproduction*. 2005. vol.130. no 5. P. 655–668.

10. Lickert H. Betatrophin fuels β cell proliferation: first step toward regenerative therapy? *Cell Metabolism*. 2013. vol. 18 no 1. P. 5–6.

11. Chen R.W., Qin Z.H, Ren M. Regulation of c-Jun N-terminal kinase, p38 kinase and AP-1 DNA binding in cultured brain neurons: roles in glutamate excitotoxicity and lithium neuroprotection. *J. Neurochem.* 2003. no 3. P. 566–575.

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

13. Хавинсон В.Х., Соловьев А.Ю., Тарновская С.И., Линькова Н.С. Механизм биологической активности коротких пептидов: проникновение в клетку и эпигенетическая регуляция экспрессии генов // Усп. совр. биол. 2013. № 3. С. 310–316.

14. Fishbein-Kaminietsky M., Gafni M., Sarne Y. Ultralow doses of cannabinoid drugs protect the mouse brain from inflammation-induced cognitive damage. *J. Neurosci. Res.* 2014. no 12. P. 1669–1677.