

УДК615.9

ПРОТЕКТОРНОЕ ВЛИЯНИЕ ПОЛИПЕПТИДА И АМИНОКИСЛОТ НА РАЗВИТИЕ КУЛЬТУРЫ НЕРВНОЙ ТКАНИ В ПРИСУТСТВИИ ЦИКЛОФОСФАНА

*В.Б. Долго-Сабуров¹, Н.И. Чалисова²,
Л.В. Лянгинен¹, Е.С. Заломаева²*

¹ФГБУН «Институт токсикологии Федерального медико-биологического агентства», 192019, г. Санкт Петербург, Российская Федерация

²Институт физиологии им. И.П.Павлова РАН, 197034, г. Санкт Петербург, Российская Федерация

В органотипической культуре исследовали сочетанное влияние ингибитора синтеза ДНК циклофосфана, используемого для моделирования резорбтивного действия иприта, с полипептидом кортексином или с каждой из 20 кодируемых аминокислот на развитие процессов клеточной пролиферации в эксплантатах коры головного мозга крыс. При сочетанном введении циклофосфана совместно с кортексином или с каждой из 20 кодируемых аминокислот, за исключением глицина, наблюдалась отмена ингибирующего влияния цитостатического вещества. Таким образом, кортексин и аминокислоты оказывают протекторное влияние на клеточную пролиферацию в культуре ткани ЦНС при действии ипритоподобных веществ.

Ключевые слова: циклофосфан, аминокислоты, полипептиды, культура ткани.

Введение. Актуальной проблемой клинической токсикологии является поиск веществ, способных оказывать протекторное действие при нарушениях синтеза и репарации ДНК, возникающих как результат действия таких токсикантов, как иприты и иприто-подобные соединения, а также цитостатические препараты. Одним из основных патогенетических особенностей действия иприта на организм является чрезвычайная вялость процессов регенерации тканей, развитие кахексии, депрессии, ослабление защитных иммунологических реакций организма [1]. Для моделирования действия иприта используется противоопухолевый цитостатик циклофосфан. Молекулярный механизм токсического действия циклофосфана, как у иприта, связан с его алкилирующими свойствами и с угнетением системы антиоксидантной защиты [2,3].

В последние десятилетия большое внимание уделяется комплексным полипептидным препаратам, существенно увеличивающим регенерационные способности различных тканей за счет

стимуляции процессов репарации и синтеза ДНК [4-6]. Один из таких препаратов - кортексин, представляющий комплекс полипептидных фракций, экстрагированных из мозга телят, используется в неврологической практике и предположительно может оказать защиту от повреждающего действия факторов химической природы. В недавних работах [7,8], показано, что в органотипической культуре ткани каждая из 20 кодируемых аминокислот оказывает различное - стимулирующее или ингибирующее, - влияние на развитие эксплантатов. Органотипическое культивирование фрагментов тканей и анализ зоны роста эксплантатов является наиболее адекватным и удобным методом для быстрой количественной оценки направленности влияния исследуемых биологически активных веществ. *Целью данной работы* явилось исследование влияния комплексного пептида кортексина и 20 кодируемых аминокислот в присутствии циклофосфана на развитие органотипической культуры коры головного мозга крыс.

Долго-Сабуров Валерий Борисович (Dolgo-Saburov Valeriy Borisovich), доктор медицинских наук, ведущий научный сотрудник по специальности токсикология лаборатории биохимической токсикологии и фармакологии ФГБУН «Институт токсикологии Федерального медико-биологического агентства», 192019, г. Санкт Петербург, institute@toxicology.ru

Чалисова Наталья Иосифовна (Chalissova Natalia Iosifovna), профессор, доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник по специальности физиология человека и животных группы пептидной регуляции старения Института физиологии им. И.П.Павлова РАН, 197034, г. Санкт Петербург, ni_chalissova@mail.ru

Лянгинен Лидия Васильевна (Lyaginen Lidiya Vasilyevna), кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник по специальности токсикология лаборатории биохимической токсикологии и фармакологии ФГБУН «Институт токсикологии Федерального медико-биологического агентства», 192019, г. Санкт Петербург, pikalova_lidiya@mail.ru

Заломаева Екатерина Сергеевна (Zalomaeva Ekaterina Sergeevna), научный сотрудник группы пептидной регуляции старения Института физиологии им. И.П.Павлова РАН, 197034, г. Санкт Петербург, kostikorange@yandex.ru

Материалы и методы исследования. Органотипическое культивирование тканей проводили в стерильных условиях. В экспериментах использовано 1200 фрагментов коры головного мозга 3-месячных самцов крыс линии Вистар. Фрагменты коры головного помещали в чашки Петри с питательной средой, состоящей из 35% среды Игла, 35% раствора Хенкса, 25% фетальной телячьей сыворотки с добавлением глюкозы (0,6%), гентамицина (100 ед/мл). Используются комплексный биорегуляторный пептид кортексин, L-аминокислоты (фирма «Sigma» США) – глицин (Gly), аланин (Ala), аспарагин (Asn), гистидин (His), лизин (Lys), серин (Ser), глутамин (Gln), аргинин (Arg), пролин (Pro), аспарагиновая (Asp) и глутаминовая (Glu) кислоты, тирозин (Tyr), цистеин (Cys), валин (Val), треонин (Thr), метионин (Met), лейцин (Leu), изолейцин (Ile), фенилаланин (Phe), триптофан (Trp). Для пептида эффективной концентрацией было 2 нг/мл, для аминокислот 0,05 нг/мл, для циклофосфана 1 мкг/мл. Чашки Петри помещали в термостат при температуре 37°C и 5% CO₂ и через 3 сут просматривали под фазово-контрастным микроскопом с микротеленасадкой (серия 10, МТН-13 «Альфа-Телеком»). Используя программу PhotoM 1.2. определяли индекс площади (ИП) в условных единицах, как соотношение площади эксплантата (вместе с зоной выселяющихся клеток) к площади центральной зоны. Достоверность различий сравниваемых средних значений ИП контрольных и опытных образцов оценивали с помощью t-критерия Стьюдента с использованием пакета программ «Microsoft Excell».

Результаты и обсуждение. В 1-е сутки культивирования происходило распластывание эксплантатов на коллагеновой подложке, выселение пролиферирующих и мигрирующих нейроцитов, глиоцитов, фибробластов. Через 3 сут, если в эксперименте имелась стимуляция развития зоны роста в результате клеточной пролиферации, ИП экспериментальных эксплантатов увеличивался по сравнению с ИП контрольных эксплантатов.

В первой серии опытов циклофосфан вводили в культуральную среду эксплантатов коры головного мозга в концентрациях 0,1-10 мкг/мл. Обнаружено, что уже начиная с концентрации 0,1 мкг/мл начиналось частичное ингибирование зоны роста, что приводило к статистически достоверному уменьшению индекса площади на $18\pm 3\%$ ($n=20$, $p<0,05$), по сравнению с контрольными значениями ($n=19$). При дальнейших увеличениях концентраций рост эксплантатов затормаживался еще больше. При концентрации циклофосфана 0,5 мкг/мл ИП эксплантатов уменьшался уже на $25\pm 5\%$ ($n=18$, $p<0,05$), по сравнению с индексом площади в контроле ($n=20$). При введении циклофосфана в культуральную среду в концентрации 1 мкг/мл возникло статистически достоверное угнетение развития эксплантатов коры головного мозга крыс, ИП был меньше на 23-32%, чем ИП контрольных эксплантатов.

При изолированном введении в культуральную среду кортексина в эффективной концентрации 2 нг/мл выявлено статистически достоверное увеличение зоны роста эксплантатов и ИП увеличивался на $28\pm 5\%$ ($n=20$, $p<0,05$), по сравнению с значением ИП в контроле ($n=19$) (табл. 1). При сочетанном действии циклофосфана с кортексином наблюдалось устранение ингибирующего влияния цитостатика и статистически не достоверная стимуляция роста эксплантатов коры головного мозга на $7\pm 3\%$ ($n=20$, $p<0,05$) по сравнению с контрольным значением ИП ($n=20$). Для того, чтобы подтвердить протекторное действие кортексина на фоне действия цитостатика, были проведены эксперименты с введением этих веществ с интервалами во времени 10 мин после введения каждого препарата. Ингибирующее влияние циклофосфана уменьшилось при одновременном введении веществ в целом на 31%, а при разновременном на 3% и 6% (табл. 1).

Таким образом, наиболее эффективное протекторное влияние происходит при одновременном введении в питательную среду полипептида и цитостатика.

Таблица 1

Влияние кортексина и циклофосфана (ЦФ) на индекс площади (ИП) эксплантатов коры головного мозга крыс

ИП (%) по отношению к контролю				
Кортексин	ЦФ	Кортексин одновременно с ЦФ	Кортексин, через 10 мин ЦФ	ЦФ, через 10 мин кортексин
+28±5*	-24±5*	7±3	-18±5*	-21±3*

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

Влияние аминокислот, циклофосфана и их сочетаний на индекс площади (% по отношению к контролю) эксплантатов коры головного мозга крыс

Аминокислоты (АК)	АК (0,05 нг/мл)	Циклофосфан (ЦФ) (1 мкг/мл)	ЦФ+АК
Gly	-30±9*	-29±5*	-27±3*
Ala	3±1	-25±3*	2±1
Asn	5±3	-32±7*	11±5
Hys	+42±7*	-27±3*	-8±3
Lys	3±2	-29±5*	-10±2
Ser	-5±2	-31±5*	-3±1
Gln	-15±6	-23±2*	-4±2
Arg	8±5	-25±5*	8±3
Pro	-23±2*	-24±3*	-15±2
Glu	24±3*	-32±4*	6±2
Asp	+47±7*	-27±2*	1±1
Cys	-2±1	-27±5*	7±1
Tyr	-20±5*	-29±7*	-5±3
Val	+50±9*	-25±5*	9±5
Thr	+41±5*	-29±5*	4±3
Met	+39±9*	-25±7*	-11±5
Leu	+45±11*	-27±5*	-7±1
Ile	+42±9*	-28±7*	3±1
Phe	-7±5	-31±9*	-6±2
Trp	-18±3*	-26±5*	8±3

Примечание: * $p < 0,05$ по сравнению с контролем.

Изучены влияния аминокислот на эксплантаты коры головного мозга. При изолированном введении в культуральную среду гистидина, глутаминовой и аспарагиновой кислот, валина, треонина, метионина, лейцина, изолейцина обнаружено увеличение ИП эксплантатов на 24-50%, по сравнению с контрольными ИП (табл.2).

При сочетанном введении циклофосфана в культуральную среду в концентрации 1 мкг/мл с глутаминовой кислотой в эффективной кон-

центрации 0,05 нг/мл, происходило устранение угнетающего эффекта на эксплантаты, которое выражалось в том, что устранялось ингибирующее влияние циклофосфана, снижающее ИП на 32±4 % ($n=24$, $p < 0,05$), по сравнению с контролем ($n=20$), и происходило статистически не достоверное увеличение зоны роста эксплантатов на 6±2% ($n=24$, $p > 0,05$) Таким образом, ингибирующее влияние циклофосфана в целом уменьшилось на 38% (рис.1).

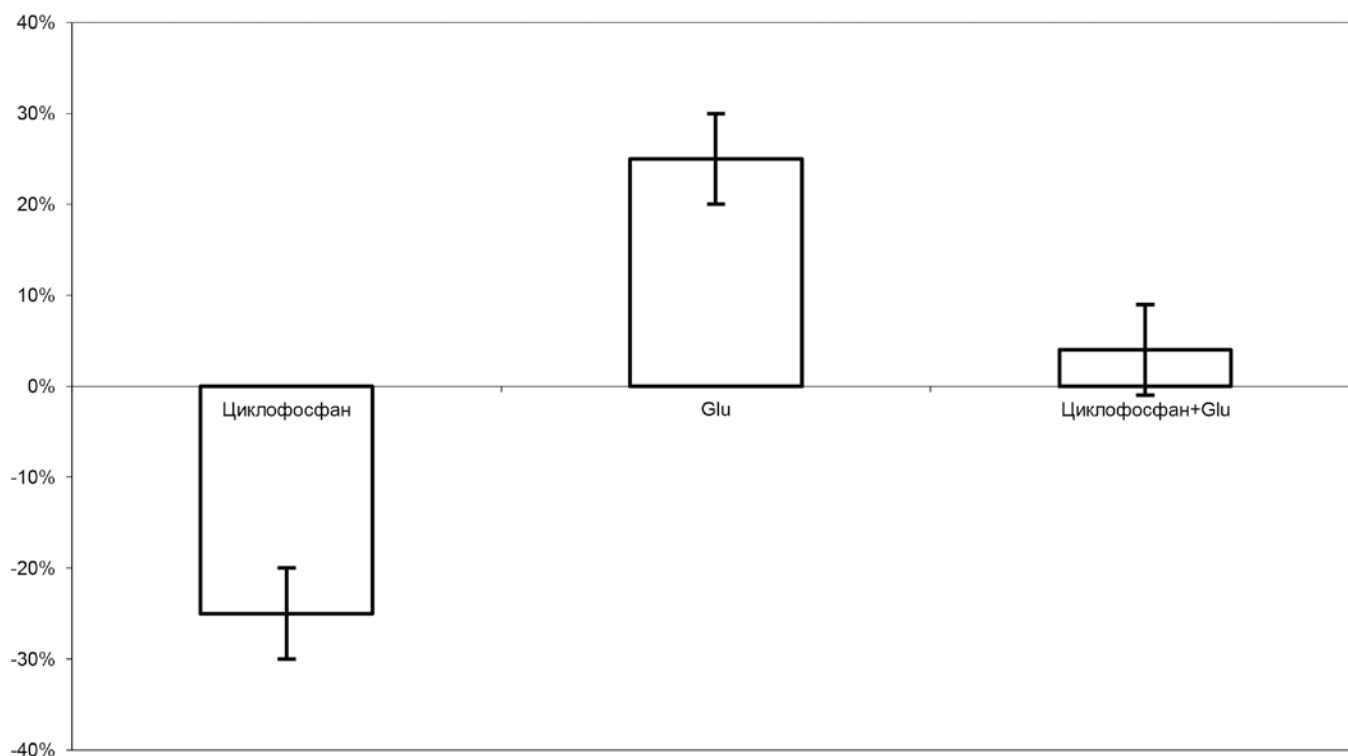


Рис. 1. Влияние циклофосфана, глутаминовой кислоты (Glu) и одновременного введения в культуральную среду циклофосфана и глутаминовой кислоты на индекс площади (ИП) эксплантатов коры головного мозга крыс. По оси ординат: индекс площади в %. Вертикальные отрезки – 95% доверительные интервалы средних значений. * – достоверные различия, по сравнению с контролем ($p < 0,05$).

Устранение ингибирующего влияния цитостатика на культуру нервной ткани на 17-21% отмечалось также при сочетанном действии с аминокислотами (за исключением глицина), не оказывавшими стимулирующего влияния на эксплантаты. Полученные нами данные показывают, что кодируемые аминокислоты, являющиеся простейшими регуляторами физиологических функций [9-11], способны устранять ингибирующий эффект циклофосфана в органотипической культуре нервной ткани. В настоящее время накапливаются данные, подтверждающие концепцию о том, что в организме имеются относительно независимые регуляторные системы – пептидная и аминокислотная [12-13]. Результаты наших экспериментов показывают, что полипептид и кодируемые аминокислоты могут оказывать протекторное действие в присутствии цитостатического агента. Возможным объяснением может быть то, что иприто-подобное вещество циклофосфан способно вступать в связь с анионами фосфорных и карбоновых кислот, фенолов, а также с аминокислотами. Эти химические радикалы широко представлены в нуклеиновых кислотах, ферментах и структурных белках. Возможно, при сочетанном введении циклофосфана с по-

липептидом или аминокислотами, цитостатик связывается с аминокислотными группами пептида или аминокислот, теряя возможность связывания с другими химическими радикалами в клетках ткани.

Выводы:

1. При действии циклофосфана, моделирующего резорбтивное действие иприта, в культуре ткани коры головного мозга происходит угнетение клеточной пролиферации. Этот эффект циклофосфана необходимо учитывать при развитии побочных последствий химиотерапии с его применением, т.к. в случаях курсового применения препарата могут развиваться патологические изменения в тканях ЦНС.

2. Полипептид кортексин и кодируемые аминокислоты устраняют ингибирующее действие циклофосфана в культуре ткани коры головного мозга. Зона роста эксплантатов после сочетанного воздействия с циклофосфаном с этими веществами увеличивалась, достигая контрольных значений.

3. Создается база для разработки методов терапевтического использования полипептида кортексина и аминокислот при лечении последствий отравлений ипритом и для снятия побочных эффектов курса цитостатиков в онкологии.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Beheshti J., Mark E., Akbaei H. Mustard lung secrets: Long term clinicopathological study following mustard gas exposure. *Pathol. Res. Pract.* 2006; 202 (10): 739–44.
2. Кашуро В.А., Глушков С.И., Карпищенко А.И., Новикова Т.М., Глушкова Т.И., Минаева Л.В., Сибирев С.А. Состояние системы глутатиона в тканях паренхиматозных органов лабораторных животных при повторном введении циклофосфана. *Нефрология.* 2006; 10 (4): 82–
3. Кашуро В.А., Карпищенко А.И., Куценко С.А., Глушков С.И. Возможность использования определения показателей системы глутатиона в лабораторной диагностике осложненной курсового лечения циклофосфаном. *Клиническая лабораторная диагностика.* 2002; (10): 43.
4. Головки А.И., Иванов М.Б., Башарин В.А., Носов А.В. Терапевтическая эффективность церебролизина и пираретама при закрытой черепно-мозговой травме у крыс на фоне острой интоксикации этанолом. *Medline.ru.* 2003; 4 (1): 482–5.
5. Иванов М.Б., Башарин В.А., Сорокина Е.Г., Гранстрем О.К. Применение церебрамида для восстановления высших нервных функций после черепно-мозговой травмы. *Terra Medica.* 2007; (6): 30–4.
6. Коваленко А.Л., Носов А.В., Башарин В.А., Иванов М.Б., Александров М.В., Луцкий М.А. Цитофлавин и церебролизин в коррекции последствий экспериментального геморрагического инсульта. *Профилактическая и клиническая медицина.* 2002; (3): 104–
7. Чалисова, Н.И. Концевая Е.А., Войцеховская М.А., Комашня А.В. Регуляторное влияние кодируемых аминокислот на основные клеточные процессы у молодых и старых животных. *Успехи геронтологии.* 2011; 24 (2): 189–99.
8. Чалисова Н.И., Иванов М.Б., Аржавкина Л.Г., Пикалова Л.В., Смирнов А.В. Протекторное влияние пептидов и аминокислот на развитие культуры лимфоидной ткани в присутствии циклофосфана. *Токсикологический вестник.* 2010; (4): 41–5.
9. Vary T. Oral leucine enhances myocardial protein synthesis in rats acutely administered ethanol. *J Nutr.* 2009; 139(8):1439–
10. Brasse-Lagnel C., Lavoinne A., Husson A. Control of mammalian gene expression by amino acids, especially glutamine. *Febs J.* 2009; 276: 1826–44.
11. Fafournoux P., Averous J., Bruhat A., Carraro V., Jousse C., Maurin A.C. et al. Adaptation to the availability of essential amino-acids: role of GCN2/eIF2 /ATF4 pathway. *Biol Aujourd'hui.* 2015; 209 (4): 317–
12. Кашуро В.А., Батоцыренова Е.Г., Елаева Н.Л., Савенко Ю.Н., Лапина Н.В., Аксёнов В.В. Динамика содержания нейротрофических факторов головного мозга при экспериментальной коме у крыс. *Казанский медицинский журнал.* 2013; 94 (5): 695–
13. Швецов А.В., Дюжинова Н.А., Савенко Ю.Н., Батоцыренова Е.Г., Кашуро В.А. Влияние экспериментальной комы на экспрессию белка bcl-2 и каспаз-3, 9 в мозге крыс. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины.* 2015; 160 (8): 178–81.

REFERENCES:

1. Beheshti J., Mark E., Akbaei H. Mustard lung secrets: Long term clinicopathological study following mustard gas exposure. *Pathol. Res. Pract.* 2006; 202 (10): 739–44.
2. Kashuro V.A., Glushkov S.I., Karpishchenro A.I., Novikova T.M., Glushkova T.I., Minaeva L.V., Sibirev S.A. Glutathione system in parenchymatous tissues of laboratory animals by repeated cyclophosphane introduction. *Nephrology.* 2006; 10 (4): 82–
3. Kashuro V.A., Karpishchenro A.I., Kutsenko S.A., Glushkov S.I., Possibility of use of glutathione system parameters in laboratory diagnostics of the complications of cyclophosphane cure treatment. *Clinic laboratory diagnostics.* 2002; (10): 43.
4. Golovko A.I., Ivanov M.B., Basharin V.A., Nosov A.V. Therapeutic effect of cerebrolysin and pirapetam by the craniocerebral trauma in rats on the background of acute ethanol intoxication. *Medline.ru.* 2003; 4 (1): 482–5.
5. Ivanov M.B., Basharin V.A., Sorokina E.G., Granstrem O.K. Cerebramide use for the repair of higher nervous functions after craniocerebral trauma. *Terra Medica.* 2007; (6): 30–4.
6. Kovalenko A.L., Nosov A.V., Basharin V.A., Ivanov M.B., Alexandrov M.V., Lutsik M.A. Cytoflavinum and cerebrolysin in the correction of sequela of the experimental haemorrhagic insult. *Prophylactic and Clinical Medicine.* 2002; (3): 104–
7. Chalisova N.I., Kontsevaya E.A., Voitsekhovskaya M.A., Komashnya A.V. Regulatory effect of the coded amino acids on basic cellular processes in young and old rats. *Advance in Gerontology.* 2011; 24 (2): 189–99.
8. Chalisova N.I., Ivanov M.B., Ar-gavkina L.G., Pikalova L.V., Smirnov A.V. Protector effect of peptides and amino acids on the development of lymphoid tissue culture at the cyclophosphane presence. *Toxicological Review.* 2010; (4): 41–5.
9. Vary T. Oral leucine enhances myocardial protein synthesis in rats acutely administered ethanol. *J Nutr.* 2009; 139(8):1439–
10. Brasse-Lagnel C., Lavoinne A., Husson A. Control of mammalian gene expression by amino acids, especially glutamine. *Febs J.* 2009; 276: 1826–44.
11. Fafournoux P., Averous J., Bruhat A., Carraro V., Jousse C., Maurin A.C. et al. Adaptation to the availability of essential amino-acids: role of GCN2/eIF2 α /ATF4 pathway. *Biol Aujourd'hui.* 2015; 209 (4): 317–
12. Kashuro V.A., Batotsirenova E.G., Elaeva N.L., Savenko Yu.N., Lapina N.V., Akseonov V.V. Dynamic of the neurotrophic factor content in the brain by the experimental coma in rats. *Medical J. of Kazan.* 2013; 94 (5): 695–
13. Shvetsov A.V., Dyuzhikova N.A., Savenko Yu.N., Batotsirenova E.G., Kashuro V.A. Effect of the experimental coma on expression of bcl-2 protein and caspase-3, 9 in rat brain. *Bull. Exper. Biology Medicine.* 2015; 160 (8): 178–81.

V.B. Dolgo-Saburov¹, N.I. Chalisova², L.V. Lyanginen¹, E.S. Zalomaeva²

PROTECTIVE EFFECT OF POLYPEPTIDE AND AMINO ACIDS ON THE DEVELOPMENT OF THE NERVOUS TISSUE CULTURE IN THE PRESENCE OF CYCLOPHOSPHAMIDE

¹Institute of Toxicology, Federal Medical-Biological Agency, 192019, St. Petersburg, Russian Federation

²I.P. Pavlov Institute of Physiology, Russian Academy of Sciences, 199034, Saint-Petersburg, Russian Federation

In an organotypic culture, an investigation was conducted into combined effects of cyclophosphamide DNA as synthesis inhibitor used to model a resorptive action of mustard gas, and cortexin polypeptide or each of 20 encoded amino acids on the development of cell proliferation in cerebral cortex explants of the rat. The combined administration of cyclophosphamide together with cortexin or with each of the 20 encoded amino acids, except glycine, showed suppression of the cytostatic agent inhibitory effect. Thus, cortexin and amino acids have a protective effect on cell proliferation in the tissue culture of the central nervous system under the action of mustard-like substances.

Keywords: Cyclophosphamide, amino acids, polypeptides, tissue culture.

Материал поступил в редакцию 13.01.2017 г.