

ВЛИЯНИЕ ПЕПТИДОВ НА ПРОЛИФЕРАТИВНУЮ АКТИВНОСТЬ КЛЕТОК СЕТЧАТКИ И ПИГМЕНТНОГО ЭПИТЕЛИЯ

В.Х.Хавинсон, В.Н.Земчихина*, С.В.Трофимова, В.В.Малинин

Санкт-Петербургский институт биорегуляции и геронтологии СЗО РАМН;
*Институт биологии гена РАН, Москва

Изучали пролиферативную активность клеток культуры сетчатки и пигментного эпителия под воздействием полипептидного препарата, выделенного из сетчатки, ретиналамина и синтетического пептида — эпیتالона (Ala-Glu-Asp-Gly). Результаты экспериментов свидетельствуют о тканеспецифической способности ретиналамина и эпیتالона в определенных концентрациях вызывать активную пролиферацию клеток культуры сетчатки и пигментного эпителия.

Ключевые слова: пептиды, ретиналамин, эпیتالон, культура клеток сетчатки и пигментного эпителия

Известно, что имеется два класса биологически активных веществ — ростовые факторы (стимулирующие рост клеток в клеточных культурах) и индукционные факторы (контролирующие пути дифференцировки клеток в процессе эмбриогенеза) [9,10,13]. Все они являются низкомолекулярными белками. Появление отдельного класса препаратов — пептидных регуляторов с молекулярной массой 1-10 кД, выделенных из различных органов и тканей, а также синтезированных на их основе коротких пептидов, расширило круг регуляторных факторов, участвующих в сложнейших процессах клеточных взаимодействий [6,7,11]. Ранее было исследовано индукционное влияние полипептидного препарата, выделенного из сетчатки, ретиналамина на полипотентные клетки эктодермы ранней гаструлы *Xenopus Laevis* [8]. Установлено, что под воздействием ретиналамина в эктодерме ранней гаструлы развивается нейральная дифференцировка, включая мозг, сетчатку и пигментный эпителий. Целью данной работы явилось изучение влияния ретиналамина и синтетического пептида эпیتالона (Ala-Glu-Asp-Gly) на культуру клеток сетчатки и пигментного эпителия.

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

В качестве экспериментального объекта использовали первичные клеточные культуры сетчатки и пигментного эпителия крыс [4,5]. Субстратом для культивирования клеток был взят коллаген типа 1 ("Sigma"). Для культуральной среды использовали стерильную среду 199 с 10% сывороточного альбумина с добавлением стандартного набора антибиотиков. В каждую культуральную лунку вносили по 300 тыс. клеток сетчатки или пигментного эпителия. Пептидные препараты ретиналамин (ООО "Самсон-Мед") и эпیتالон (Санкт-Петербургский институт биорегуляции и геронтологии СЗО РАМН) применяли в концентрациях 2, 10, 20, 50, 100, 200 нг/мл. Пептиды добавляли в культуру клеток два раза в неделю в течение 1 мес. Клетки инкубировались в CO₂-инкубаторе при 100% влажности и температуре 37°C [2].

Для определения митогенной тканеспецифической активности исследуемых пептидов в культуре клеток сетчатки и пигментного эпителия применяли метод спектрофотометрического определения количества живых клеток в суспензии. Клетки окрашивали 0.75% раствором метиленового синего в 75% этаноле. К осадку окрашенных и отмытых дистиллированной водой клеток добавляли 0.5 мл 0.5 М HCl в 50% этаноле и получали пробу для определения оптической плотности раствора. Калибровочные кривые зависимости оптической плотности раст-

вора от концентрации клеток позволили перейти от полученной в эксперименте оптической плотности раствора к количеству клеток в суспензии. Оптическую плотность определяли с помощью прибора "Multiskan ex Primary EIA V. 2.1-0" с программным обеспечением "Labsystems Genesis V3.03" в 96-луночных планшетах ("Costar") с плоским дном при $\lambda=650$ нм. Статистическую обработку материалов проводили с использованием параметрического *t* критерия Стьюдента [1].

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Анализ результатов воздействия исследуемых пептидов на культуры клеток сетчатки и пигментного эпителия показал статистически достоверную зависимость митогенной активности клеток от концентрации ретиналамина и эпиталона. Установлено, что клетки пигментного эпителия пролиферируют несколько активнее, чем клетки сетчатки. Результаты, полученные после 1-й недели культивирования, показали, что наибольшая митогенная активность наблюдается при воздействии ретиналамина в концентрации 200 нг/мл на клетки сетчатки и пигментного эпителия. Через неделю культивирования при воздействии эпиталона на культуры клеток сетчатки максимальная митогенная активность наблюдалась при концентрациях 10 и 100 нг/мл, а на клетки пигментного эпителия — при концентрациях 10 и 20 нг/мл. Митогенная активность клеток пигментного эпителия и сетчатки при воздействии рети-

наламина в течение последующих 3 нед оказалась максимальной при концентрациях 50 и 100 нг/мл. При воздействии на клеточные культуры эпиталона в течение последующих 3 нед наиболее активная пролиферация клеток наблюдалась при концентрациях 2 и 10 нг/мл (табл. 1, 2).

Полученные данные указывают на значительную способность ретиналамина и эпиталона в определенной концентрации тканеспецифически вызывать активную пролиферацию клеток культуры сетчатки и пигментного эпителия. Пептидные препараты могут контролировать пролиферативную активность клеток соответствующей ткани и запускать процесс дифференцировки в полипотентной ткани. Более того, запускается не просто дифференцировка, а каскад взаимосвязанных дифференцировок, например, в тканях глаза [3]. Возможно, пептидный сигнал изменяет функциональную активность генома, индуцируя экспрессию генов, участвующих в процессе дифференцировки тканей глаза. По-видимому, характер воздействия пептидных препаратов зависит от функционального состояния и степени дифференцировки клеток, а значит и от состояния их мембранно-рецепторного комплекса. При воздействии на дифференцированные клетки взрослого организма в кратковременной культуре наблюдается пролиферативная активность клеток, однако при этом поддерживается и их тканевая специфичность. Необходимо подчеркнуть, что процесс пролиферации не подавляет процесс поддержания тканеспецифичес-

Таблица 1. Динамика роста клеток сетчатки в культуре ткани глаза крыс под воздействием пептидов ($M \pm m, \times 10^5$ /мл)

Концентрация препарата, нг/мл	Сутки			
	7-е	14-е	21-е	28-е
Контроль (физиологический раствор)	0.30±0.01	2.80±0.11	4.60±0.23	9.40±0.51
Ретиналамин 2	0.50±0.03	3.70±0.30	5.70±0.41	10.40±0.46
10	2.20±0.19*	3.69±0.24	11.20±1.57*	7.90±0.84
20	0.60±0.04*	5.90±0.27*	10.90±0.76*	10.10±0.29
50	4.20±0.27*	8.70±0.26*	16.30±0.91*	34.20±0.93*
100	5.90±0.36*	8.40±0.23*	17.80±1.21*	40.80±1.02*
200	8.70±1.63*	1.70±0.11	10.40±1.46*	5.70±0.83*
Эпиталон 2	0.20±0.05	4.50±0.36*	33.40±0.91*	40.20±0.88*
10	4.50±0.24*	5.40±0.13*	33.40±0.27*	79.20±1.43*
20	2.70±0.14*	4.20±0.20*	9.50±0.53*	19.80±1.28*
50	0.70±0.09*	1.50±0.22	4.90±0.32	11.30±0.68*
100	4.50±0.20*	6.70±0.31*	8.70±0.25*	7.20±0.61
200	1.50±0.16*	4.90±0.21*	6.70±0.21*	9.20±0.11

Примечание. Здесь и в табл. 2: * $p < 0.05$ по сравнению с контролем.

Таблица 2. Динамика роста клеток пигментного эпителия в культуре ткани глаза крыс под воздействием пептидов ($M \pm m, \times 10^6/\text{мл}$)

Концентрация препарата, нг/мл	Сутки			
	7-е	14-е	21-е	28-е
Контроль (физиологический раствор)	0.30±0.01	3.30±1.01	4.90±1.52	14.20±1.64
Ретиналамин 2	6.90±1.70*	8.90±0.53*	10.40±0.38*	13.60±0.61
10	8.50±0.49*	9.50±1.02*	11.60±0.90*	13.10±0.34
20	6.70±1.53*	5.60±0.53*	7.20±0.98*	13.10±0.56
50	7.70±0.96*	13.90±0.28*	23.20±3.30*	33.60±1.20*
100	8.50±0.41*	16.80±1.02*	30.10±2.91*	48.60±3.55*
200	8.70±0.22*	10.30±0.63*	12.60±1.25*	16.40±1.58
Эпиталон 2	3.50±0.19*	9.20±0.36*	25.60±1.60*	42.10±1.24*
10*	4.50±0.22*	9.40±0.24*	28.30±1.06*	81.20±3.29*
20	4.5±0.1*	7.20±0.25*	17.80±0.34*	33.40±3.46*
50	1.00±0.12*	8.40±1.47*	16.30±0.32*	16.60±0.42
100	1.20±0.19*	4.50±0.70	7.70±0.45*	12.10±0.85
200	3.50±0.15*	6.30±0.39*	8.70±0.43*	19.10±1.63*

кой дифференцировки, т.е. два механизма работают синхронно, и клетки в процессе культивирования не теряют признаков дифференцированной ткани.

Следует отметить, что при воздействии пептидными препаратами на полипотентные клетки в культуре, происходит воздействие на эмбриональные клетки, количество рецепторов на мембране которых является максимальным и специфичным [8]. Это и определяет свойства полипотентной ткани, клетки которой в этот момент ждут сигнала не к началу активной пролиферации, а запускающего специфический каскад превращений клеток, итогом которых являются дифференцированные клетки организма.

Итак, ретиналамин и эпиталон являются многофункциональными препаратами. Пептидные регуляторы способны воздействовать как на дифференцированные клетки взрослого организма, запуская пролиферацию клеток и поддерживая при этом тканевую специфичность, так и на полипотентные эмбриональные клетки, индуцируя тканеспецифическую дифференцировку [8]. Активность пептидных препаратов является тканеспецифической, но форма ее проявления — пролиферация или дифференцировка клеток, зависит от функционального состояния биосистемы, на которую оказывается воздействие.

Важным достижением проведенного эксперимента является то, что его результаты в значительной степени раскрывают механизм высо-

кой терапевтической эффективности ретиналамина и эпиталона у животных и человека при различной патологии сетчатки [12].

ЛИТЕРАТУРА

1. Бахвалов Н., Жидков Н., Кобельков Г. Численные методы. М., 2000.
2. Бродский В.Я., Хавинсон В.Х., Золотарев Ю.А. и др. // Известия АН. Сер. биол. 2001. № 5. С. 517-521.
3. Лопашов Г.В., Земчихина В.Н. // Успехи соврем. биол. 2000. Т. 120, № 6. С. 540-549.
4. Пинаев Г.П. Методы культивирования клеток. Л., 1988.
5. Фрейни Р. Культуры животных клеток. М., 1989.
6. Хавинсон В.Х. // Бюл. exper. биол. 2001. Т. 132, № 8. С. 228-229.
7. Хавинсон В.Х., Малинин В.В., Чалисова Н.И., Григорьев Е.И. // Успехи геронтол. 2002. Вып. 9. С. 95-100.
8. Хавинсон В.Х., Малинин В.В., Трофимова С.В., Земчихина В.Н. // Бюл. exper. биол. 2002. Т. 134, № 11. С. 560-563.
9. Asashima M., Nakano H., Shimada K. // Roux Arch. Devel. Biol. 1990. Vol. 198. P. 330-335.
10. Chertov O.Yu., Krasnosektskii A.L., Bogdanov M.E., Hoperskaya O.A. // Biomed. Sci. 1990. Vol. 1, N 5. P. 499-506.
11. Khavinson V. // Neuroendocrinol. Lett. 2002. Vol. 23, Suppl. 3. P. 11-144.
12. Khavinson V., Razumovsky M., Trofimova S. et al. // Ibid. 2002. Vol. 23, N 4. P. 365-368.
13. Lopashov G.V., Golubeva O.N., Zviadadze K.G. // Differentiation. 1997. Vol. 61. P. 237-242.