

Л. С. Козина¹, А. В. Арутюнян¹, С. Л. Стволинский², В. Х. Хавинсон¹

ОЦЕНКА БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ РЕГУЛЯТОРНЫХ ПЕПТИДОВ В МОДЕЛЬНЫХ ЭКСПЕРИМЕНТАХ IN VITRO

¹ Санкт-Петербургский институт биорегуляции и геронтологии СЗО РАМН, 197110 Санкт-Петербург, пр. Динамо, 3; e-mail: milakozina@mail.ru; ² Научный центр неврологии РАМН, 125367 Москва, Волоколамское шоссе, 80; stvolinsky@mail.ru

Проведено сравнительное исследование биологических эффектов коротких пептидов (пинеалона, везугена, вилона и эпیتالона) на различных моделях в опытах *in vitro*. Изучены прямая антиоксидантная активность исследуемых соединений, их влияние на индуцированное окисление липопротеинов плазмы крови, скорость осмотического гемолиза эритроцитов и образование активных форм кислорода гранулярными клетками мозжечка крыс. В качестве препаратов сравнения были использованы равные концентрации нейропептида карнозина и проникающего через клеточную мембрану антиоксиданта *N*-ацетилцистеина. Полученные данные свидетельствуют о том, что исследуемые короткие пептиды оказывают прямое антиоксидантное действие лишь при использовании высоких (миллимолярных) концентраций, но способны ограничивать процессы перекисного окисления, вероятно, модифицируя структуру липопротеиновых комплексов. Они способны также повышать устойчивость мембран эритроцитов к осмотическому гидролизу. Установлено также их стимулирующее влияние на стационарный уровень активных форм кислорода в изолированных гранулярных клетках мозжечка, наряду со снижением доли погибших клеток в популяции нейронов. Полученные данные дают основание полагать, что исследованные короткие пептиды могут оказаться перспективными биорегуляторами апоптоза/некроза.

Ключевые слова: короткие пептиды, антиоксидантная активность, активные формы кислорода, осмотический гемолиз, окислительный стресс, нейрональные клетки

Биологически активные пептиды эндогенного происхождения можно рассматривать как перспективные средства для повышения сопротивляемости организма человека к экстремальным воздействиям, профилактики преждевременного старения и возрастной патологии. Пептидные биорегуляторы эффективны в чрезвычайно низких концентрациях, обладают высокой избирательностью и полифункциональностью, не вызывают побочных эффектов и легко расщепляются в тканях без образования токсических продуктов [1, 5, 7].

Одним из наиболее важных механизмов реализации эффекта биологически активных пептидов является их влияние на интенсивность свободно-

радикального окисления в органах и тканях [8]. Известно, что окислительный стресс, характеризующийся дисбалансом между уровнем образующихся в тканях активных форм кислорода и активностью антиоксидантных систем, является важным патогенетическим фактором в развитии сердечно-сосудистых и неврологических заболеваний.

Пептидные биорегуляторы, в том числе нейропептиды, обладающие антиоксидантной активностью, хотя и не являются препаратами для лечения специфических патологических состояний, их применение может быть эффективным способом коррекции различных патологий. Однако терапевтическое применение природных пептидных биорегуляторов ограничено проблемами ГЭБ, относительной быстротой их распада и иммунным ответом организма. Для преодоления этих трудностей разработана методология выявления комплексных полипептидных препаратов (цитомединов), включающая определение аминокислотного состава нейропептидов, сохраняющих специфическую активность, их идентификацию и последующий синтез аналогов активных фрагментов, так называемых коротких пептидов [11].

К числу коротких пептидов, обладающих антиоксидантной активностью и выполняющих ряд регуляторных функций в организме, относятся вилон (*Lys-Glu*), везуген (*Lys-Glu-Asp*), эпیتالон (*Ala-Glu-Asp-Gly*) и пинеалон (*Glu-Asp-Arg*), синтезированные на основании аминокислотного анализа цитомединов тималина, вазаламина и эпیتالона [9, 11].

В данной работе для выяснения молекулярных механизмов действия этих соединений нами было проведено их сравнительное исследование в экспериментах *in vitro*. В качестве препаратов сравнения были использованы природные модуляторы устойчивости клеточных структур карнозин [2] и *N*-ацетилцистеин [14].

Материалы и методы

Вилон, везуген, эпیتالон и пинеалон были синтезированы в Санкт-Петербургском институте биорегуляции и геронтологии. Карнозин был приобретен у фирмы «Namari Chemicals Ltd.» (Япония), 1,1-дифенил-2-пикрилгидразил, пропиций йодид, *N*-ацетилцистеин (*NAC*), *HEPES*, *DCFH₂DA*, *FeSO₄*, *H₂O₂* — у фирмы «Sigma-Aldrich» (США).

Прямую антиоксидантную активность исследуемых соединений оценивали по их способности восстанавливать стабильный радикал 1,1-дифенил-2-пикрилгидразил (ДФПГ) [10, 13]. Эффекты коротких пептидов на индуцированное окисление липопротейнов, которые выделяли из плазмы крови здоровых доноров, измеряли с помощью *Fe²⁺*-индуцированной хемолюминесценции [15]. Исследуемые вещества с исходной концентрацией 10 мМ, приготовленные на *HEPES*-буфере (10 мМ, pH 7,4), вносили в пробу перед добавлением железа до конечной концентрации 0,5 или 1,0 мМ. Для регистрации хемолюминесценции использовали хемолюминометр LKB-1251 (Швеция).

Мембраностабилизирующее действие исследовали на модели осмотического гемолиза эритроцитов [12]. Исследуемые вещества в конечной концентрации 1–5 мМ инкубировали с цельной кровью (стабилизированной 3,8 % цитратом натрия) в течение 30 мин, после чего добавляли в кювету, содержащую 1 мл физиологического раствора. После регистрации исходной оптической плотности в кювету добавляли 1,2 мл воды, регистрируя гемолиз, вызванный снижением осмотичности среды, на спектрофотометре ($\lambda=660$ нм), снабженным цифровым преобразователем.

Действие исследуемых соединений на образование активных форм кислорода гранулярными клетками мозжечка крыс исследовали методом проточной цитометрии [3]. Использовали первичную культуру нейронов, выделенную из 9-дневных крыс линии Vistar. Клетки получали путем обработки измельченного мозжечка в растворе Тироде с 0,2 % диспазой — коллагеназой для разрушения межклеточных контактов (30 мин при 33°C) с последующим отмыванием кусочков ткани, их взмучиванием и фильтрованием полученной суспензии через тефлоновый фильтр с размером пор 50 мкм. Полученная суспензия содержала около 2 млн клеток в 1 мл. Цитометрический анализ проводили на приборе FacStar («Becton Dickinson», США), исследуя популяцию *NMDA*-чувствительных клеток, которую выделяли гейтом, соответствующим размеру гранулярных клеток (около 10 мкм).

Исходные вещества в концентрации 10 мМ были растворены в буфере *HEPES* (10 мМ, pH 7,4), карнозин и *NAC* растворяли в воде и доводили pH до 7,4. Все вещества использовали в конечной концентрации 1 мМ, добавляя их к клеткам непосредственно после выделения. После 120 мин преинкубации клетки нагружали в течение 40 мин при 37°C флуоресцентным красителем *DCFH₂DA* в конечной концентрации 0,1 мМ для определения активных форм кислорода. Затем клетки стимулировали *H₂O₂* (10 мМ) в течение 30 мин при 37°C. За 1 мин до измерения флуоресценции к суспензии клеток добавляли пропиций йодид в конечной концентрации 10 мкг/мл для оценки доли

нежизнеспособных клеток (имеющих повреждения клеточной мембраны). Полученные результаты анализировали с помощью компьютерной программы WinMDI 2.7. Статистическую обработку данных проводили, используя пакет программ «BIOSTAT» [4].

Результаты и обсуждение

Исследование прямой антиоксидантной активности коротких пептидов

Результаты анализа антирадикальной активности исследуемых соединений приведены в табл. 1. Как видно из представленных данных, *NAC* уменьшает оптическую плотность проб, содержащих ДФПГ, проявляя сильное антиоксидантное действие уже в концентрации 0,25 мМ. Карнозин в этой системе выступает как слабый антиоксидант. Ни один из исследуемых коротких пептидов, за исключением эпیتالона, не обладает способностью тушить ДФПГ-радикал. Действие эпیتالона проявляется еще слабее по сравнению с карнозином. Везуген и пинеалон даже несколько увеличивают оптическую плотность проб, что может служить косвенным указанием на возможность их взаимодействия с ДФПГ с образованием промежуточных продуктов. Условно эта способность, наиболее заметная в случае везугена, может быть названа «прооксидантной». Природа такой активности остается неизвестной.

Таблица 1

Антирадикальная активность регуляторных пептидов

Вещество	Концентрация, мМ	ΔA , мкмоль ($M \pm m$)
<i>N</i> -ацетилцистеин	0,25	-0,401±0,015
	0,50	-0,754±0,014
	1,0	-0,884±0,014
Карнозин	0,50	-0,006±0,001
	1,0	-0,013±0,001
Вилон	0,50	+0,030±0,003
	1,0	+0,001±0,0005
Эпیتالон	0,50	-0,006±0,001
	1,0	-0,004±0,001
Везуген	0,25	+0,078±0,005
	0,50	+0,120±0,004
	1,0	+0,553±0,017
Пинеалон	0,50	+0,015±0,001
	1,0	+0,073±0,008

Примечание. Приведены данные сравнительного действия *N*-ацетилцистеина, карнозина, вилона, эпیتالона, везугена и пинеалона на изменение оптической плотности пробы в присутствии стабильного радикала ДФПГ

Влияние исследуемых соединений на параметры Fe^{2+} -индуцированной хемолюминесценции (ХЛ) липопротеинов сыворотки крови здоровых доноров (% по отношению к контролю)

Вещество	Концентрация вещества в пробе, мМ	Параметры Fe^{2+} -индуцированной ХЛ			
		h , %	τ , %	H , %	Скорость окисления, %
Карнозин	0,5	53±6	133±8	94±6	75±10
	1	40±5	189±9	88±8	66±8
Вилон	0,5	66±6	93±10	92±7	86±6
	1	43±4	120±11	87±6	78±6
Эпиталон	0,5	69±6	116±9	94±6	83±7
	1	49±4	120±10	97±8	77±5
Везуген	0,5	54±4	100±8	94±5	92±6
	1	50±6	100±8	104±11	75±5
Пинеалон	0,5	54±4	105±10	94±9	81±5
	1	50±6	111±12,0	88±8,5	75±7

Исследование действия коротких пептидов на Fe^{2+} -индуцированное окисление липопротеинов плазмы крови человека

Как было определено нами в специальных экспериментах, результаты которых представлены в табл. 2, сами исследуемые вещества не подвергаются окислению в данных условиях, так что изменения, наблюдаемые в их присутствии, отражают их прямое действие на окисление липидного материала. Внесение $FeSO_4$ в кювету, содержащую порцию липопротеинов, инициирует быструю вспышку хемолюминесценции, пропорциональную количеству преобразованных гидроперекисей липидов (h), ее величина уменьшается в присутствии антиоксидантов, способных взаимодействовать с гидроперекисями (рис. 1). Последующая лаг-фаза (τ) характеризует собственный антиоксидантный потенциал системы (АОП), который исчерпывается по мере превращения двухвалентного железа в трехвалентное. После истощения собственного АОП вспыхивает волна хемолюминесценции с максимальной величиной вспышки H , и скорость этого

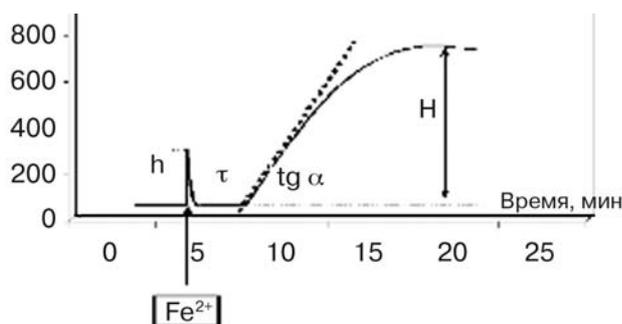


Рис. 1. Пример регистрации хемолюминесценции при окислении липопротеинов человека, индуцированном 5 мМ сернокислого железа

процесса отражает скорость окисления липидного материала [15]. Величина латентного периода τ тем больше, чем выше АОП системы. При этом, как правило, более высокий АОП коррелирует с более низкой скоростью окисления [6].

Из приведенных результатов (см. табл. 2) видно, что исследуемые соединения в разной степени влияют на окисляемость липопротеинов. Эффект вилона и эпиталона несколько слабее эффекта карнозина, а везуген лишь незначительно снижает скорость окисления, практически не влияя на величину τ . В то же время, все исследованные соединения способны эффективно связывать гидроперекиси липидов дозозависимым способом, что отражается в снижении величины h . Полученные результаты указывают на наличие у исследуемых соединений способности препятствовать окислительному повреждению липидов. С учетом того, что исследуемые соединения не проявляют способности нейтрализовать радикальные молекулы (см. табл. 1), их эффект можно объяснить стабилизирующим влиянием на структуру липопротеинов.

Исследование влияния коротких пептидов на скорость осмотического гемолиза эритроцитов

Исследуемые соединения по-разному влияли на протекание осмотического гемолиза эритроцитов крыс. НАС вообще не оказывал влияния на осмотический гемолиз, что закономерно, поскольку в развитие осмотической неустойчивости свободнорадикальные процессы не вовлекаются. Карнозин понижал скорость гемолиза на 35–40 % уже в концентрации 0,4 мМ, что объясняется его мембранопротекторными свойствами (данные не приведены). Все исследованные короткие пепти-

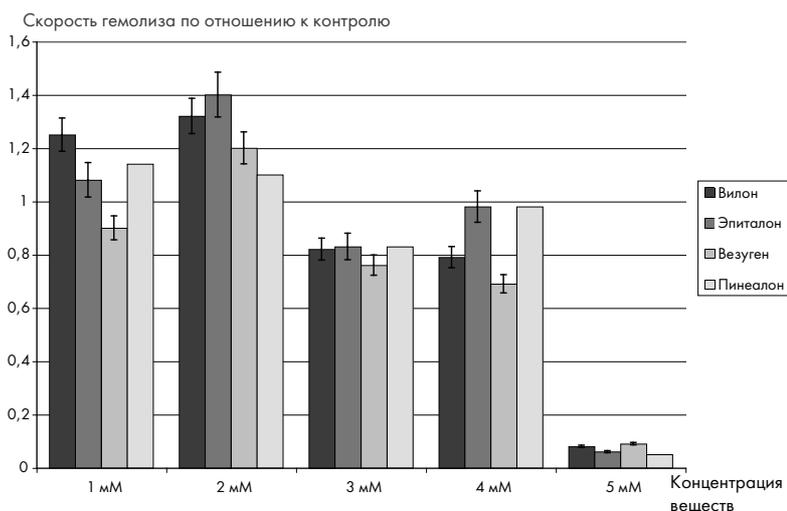
ды проявляли двойной эффект: при концентрациях 1–2 мМ они несколько увеличивали скорость гемолиза эритроцитов крысы, а при повышении концентрации стимулирующий эффект сменялся подавлением процесса гемолиза (рис. 2, а).

Сходные эффекты исследуемых соединений наблюдались и на эритроцитах человека: при концентрации, равной 3,0 мМ, исследуемые соединения повышали скорость гемолиза (особенно выраженным — в 2,5 раза по сравнению с контролем — было действие эпиталона), тогда как повышение концентрации до 5,0 мМ вызывало противоположное действие — возрастание устойчивости эритроцитов к осмотическому гемолизу (см. рис. 2, б). Полученные результаты указывают на наличие у исследуемых соединений мембранопротекторных свойств, не связанных с прямой антиоксидантной активностью.

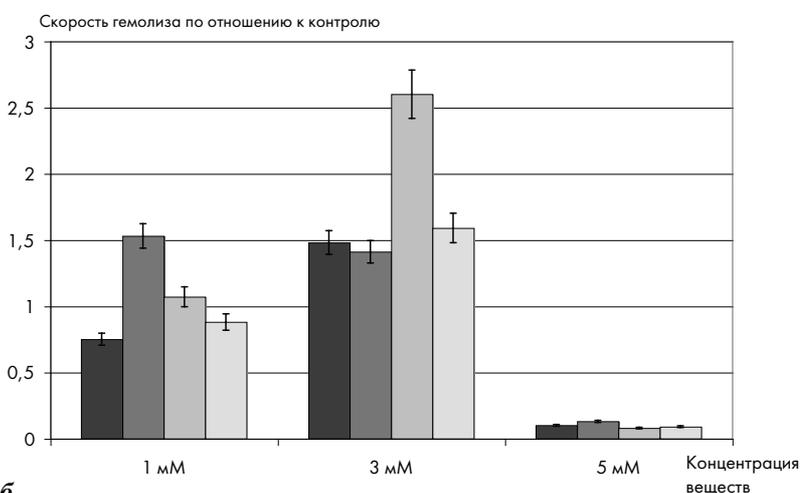
Исследование действия коротких пептидов на нейрональные клетки

Использование метода проточной цитометрии позволило оценить влияние исследуемых соединений на состояние гранулярных клеток мозжечка крыс и генерацию ими активных форм кислорода в условиях окислительного стресса, вызываемого перекисью водорода. Действие коротких пептидов в условиях индукции АФК проявляется различным образом (табл. 3).

Прединкубация клеток с 10 мМ H_2O_2 в течение 190 мин вызывала увеличение внутриклеточного уровня АФК в 7 раз. В присутствии карнозина увеличение уровня АФК происходило гораздо слабее (только в 4 раза), что указывает на то, что карнозин выступает как антиоксидант прямого действия, препятствуя накоплению АФК. НАС в этой же концентрации был гораздо менее эффективен, чем карнозин. Вилон сам по себе вызывал увеличение внутриклеточного уровня АФК (в 1,6 раз по сравнению с контролем). На этом фоне, тем не менее, наблюдалось некоторое ограничение



а



б

Рис. 2. Влияние коротких пептидов на скорость осмотического гемолиза эритроцитов крысы (а) и человека (б)

роста АФК под действием перекиси (на 16 %). Эпиталон вызывал наиболее значительное увеличение внутриклеточного уровня АФК, сравнимое с тем, что вызывается перекисью водорода (в 6,6 раз по сравнению с контролем). Добавление 10 мМ H_2O_2 на этом фоне не приводило к дополнительному росту АФК. Везуген увеличивал исходный уровень АФК в 2 раза, и на его фоне происходило дальнейшее увеличение уровня АФК в ответ на преинкубацию с 10 мМ H_2O_2 (в 1,4 раза). Пинеалон увеличивал исходный уровень АФК в 2,5 раза, на его фоне происходило дальнейшее увеличение уровня АФК в ответ на преинкубацию с 10 мМ H_2O_2 (в 2 раза), однако достигаемое значение было ниже контрольного (на 32 %).

Таким образом, исследуемые КП увеличивали продукцию АФК в клетках. На этом фоне эффективность индукции АФК перекисью водорода снижалась пинеалом на 32 %, вилонем и

Сравнение действия исследуемых соединений на уровень АФК в нейронах крыс

Используемое соединение	Флюоресценция DCF, отн. ед.		Флюоресценция DCF, % по отношению к контролю		Количество мертвых клеток, %	
	без H ₂ O ₂	с добавлением H ₂ O ₂	без H ₂ O ₂	с добавлением H ₂ O ₂	без H ₂ O ₂	с добавлением H ₂ O ₂
Контроль (без добавок)	21,6±2,0	158,7±14,6	100	100	9,6	15,0
Карнозин, 1 мМ	23,2±1,9	105,3±8,9*	108	66	4,3	6,5
НАС, 1 мМ	21,9±3,1	127,6±5,1	101	80	5,5	15,2
Вилон, 1 мМ	34,9±3,0*	134,5±9,1	161	84	6,4	10,2
Эпиталон, 1 мМ	144,0±9,8**	131,1±12,5	666	83	10,9	5,5
Везуген, 1 мМ	41,5±4,1*	221,7±12,5*	192	140	6,0	2,4
Пинеалон, 1 мМ	54,2±3,9*	108,6±3,0	250	68	6,5	3,1

* $p < 0,005$ ** $p < 0,001$ по сравнению с контролем

эпиталоном — на 20 %. Везуген увеличивал индуцированный перекисью водорода уровень АФК на 40 %. Полученные результаты подтверждают наличие «прооксидантной составляющей» в механизме действия исследуемых пептидов на нейрональные клетки.

Действие перекиси водорода на фоне везугена и пинеалона сопровождалось уменьшением количества нейронов в анализируемом гейте на 40–50 %, хотя доля мертвых клеток в анализируемой популяции снижалась. Полученные результаты позволяют предполагать способность регуляторных пептидов вовлекаться в механизм регуляции процессов апоптоза—некроза нейронов головного мозга в условиях индуцированного перекисного окисления липидов. При этом можно ожидать, что в условиях *in vivo* их эффективные концентрации при направленном действии на мозг могут быть значительно ниже, чем в модельных экспериментах.

Выводы

При определении прямой антиоксидантной активности тестируемых соединений вилон и эпиталон не проявляли способности к взаимодействию с химическим радикалом ДФПГ, что позволяет классифицировать их как соединения, не обладающие прямой антиоксидантной активностью (в противоположность карнозину и НАС). В присутствии везугена и пинеалона наблюдалось некоторое увеличение оптической плотности проб при добавлении ДФПГ, что может быть связано с их прооксидантной активностью.

Исследование индуцированного окисления липопротеинов плазмы крови человека с помощью хемолуминесцентной пробы показало, что короткие пептиды способны защищать липопротеино-

вые комплексы от Fe-индуцированного окисления, причем вилон и эпиталон обеспечивали заметное увеличение резистентности к окислению (удлиняя лаг-период развития хемолуминесценции, τ), а везуген и пинеалон существенно снижали скорость окислительного процесса. Эти данные указывают на то, что короткие пептиды способны осуществлять защиту надмолекулярных комплексов не по принципу антиоксидантного действия, а за счет их структурных перестроек.

Вилон, везуген, эпиталон и пинеалон примерно в равной степени подавляли осмотический гемолиз эритроцитов крысы и человека, хотя этот защитный эффект проявлялся при высоких (5 мМ) концентрациях. Протекторная активность исследуемых соединений была приблизительно равноценной.

Эффект коротких пептидов проявлялся также и на изолированных гранулярных клетках мозжечка. Вилон, везуген и пинеалон увеличивали стационарный уровень активных форм кислорода в клетках на 61–155 %, на этом фоне перекись водорода не только не вызывала роста внутриклеточного уровня АФК, но и приводила к понижению уровня радикалов в нейронах. При этом эти вещества, подобно карнозину, вызывали уменьшение доли мертвых клеток в гейте исследуемых нейронов. Эпиталон вызывал наибольшее увеличение (в 6,6 раза) уровня АФК в нейронах, хотя не влиял на гибель нейронов.

Литература

1. Ашмарин И. П., Каразеева Е. П. Нейропептиды // В кн: Нейрохимия. М., 1996. С. 298–234.
2. Болдырев А. А. Карнозин и защита тканей от окислительного стресса. М.: Диалог-МГУ, 1999.
3. Болдырев А. А. Дискриминация между апоптозом и некрозом нейронов под влиянием окислительного стресса // Биохимия. 2000. Т. 65. С. 981–990.

4. Гланц С. Медико-биологическая статистика (пер. с англ.). М.: Издательский дом «Практика», 1999.
5. Гомазков О. А. Нейротрофическая регуляция и стволовые клетки мозга. М.: Икар, 2006.
6. Федорова Т. Н., Реброва О. Ю., Ларский Э. Г. Модификация метода определения активности процессов перекисного окисления // Лаб. дело. 1991. № 3. С. 37–39.
7. Хавинсон В. Х., Морозов В. Г. Пептиды эпифиза и тимуса в регуляции старения. СПб.: Фолиант, 2001.
8. Хавинсон В. Х., Баринов В. А., Арутюнян А. В., Малинин В. В. Свободнорадикальное окисление и старение. СПб.: Наука, 2003.
9. Цитогены. Биологически активные добавки к пище: Метод. реком. / Под ред. чл.-кор. РАМН проф. В.Х. Хавинсона. СПб., 2006.
10. Brasnod-Williams W., Cuvelier M. E., Berset C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity // Lebens. Technol. 1995. V. 28. S. 25–30.
11. Khavinson V. Kh. Peptides and aging // Neuroendocrin. Letters. 2002. Vol. 23, Suppl.3.
12. Pribush A., Meyerstein D., Meyerstein N. Kinetics of erythrocyte swelling and membrane whole formation in hypotonic media // Biochim. biophys. Acta. 2002. Vol. 1558. P. 119–132.
13. Schlesier K., Harwat M., Bhm V., Bitsch R. Assessment of antioxidant activity by using different in vitro methods // Free Radic. Res. 2002. Vol. 36. P. 177–187.
14. Stolarek R., Bialasiewicz P., Nowak D. N-Acetylcysteine Effect on the Luminol-dependent Chemiluminescence Pattern of Reactive Oxygen Species Generation by Human Polymorphonuclear Leukocytes // Pulmonary Pharm. Therap. 2002. Vol. 15. P. 385–392.
15. Vladimirov Y. Studies of antioxidants with chemiluminescence. // In: Proceedings of the International Symposium on Natural Antioxidants. Molecular Mechanisms and Health Effects / Packer L., Traber M.G., and Xin W. (Eds.). Champaign, Illinois: AOCS Press. 1996. P. 125–144.

Adv. gerontol. 2008. Vol. 21, № 1. P. 68–73

L. S. Kozina¹, A. V. Arutjunyan¹, S. L. Stvolinsky², V. Kh. Khavinson¹

THE VALUATION OF BIOLOGICAL ACTIVITY OF REGULATORY PEPTIDES IN MODEL EXPERIMENTS *IN VITRO*

¹ St. Petersburg institute of bioregulation and gerontology of NWB of RAMS, 3 Dynamo pr., St. Petersburg 197110, Russia; e-mail: milakozina@mail.ru; ² Scientific center of neurology of RAMS, 80 Volokolamskoe shosse, Moscow 125363; e-mail: slstvolinsky@mail.ru

Biological effects of short regulatory peptides, pinealon, vesugen, vilon and epitalon were studied in model experiments *in vitro*. These peptides were found not to demonstrate direct antioxidant activity but be able to restrict lipid peroxidation of human lipoproteins by modification of their structure. The short peptides increase stability of red blood cell membranes toward osmotic hemolysis. They also elevate the stationary level of intracellular reactive oxygen species and at the same time decrease (all excepting epitalon) percent of dead cells in neuronal population. The suggestion was made that under *in vivo* conditions, short peptides may participate in apoptosis/necrosis regulation.

Key words: short regulatory peptides, antioxidant activity, reactive oxygen species, osmotic hemolysis, oxidative stress, neuronal cells