



УКРАЇНА

(19) UA

(11) 62121

(13) A

(51) 7 A61K38/00

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС

ДО ДЕКЛАРАЦІЙНОГО ПАТЕНТУ
НА ВИНАХІДВИДАЄТЬСЯ ПІД
ВІДПОВІДАЛЬНІСТЬ
ВЛАСНИКА
ПАТЕНТУ

(54) СПОСІБ КОРЕКЦІЇ АПОПТОЗУ ТИМОЦИТІВ

1

2

(21) 2002119487

(22) 28 11 2002

(24) 15 12 2003

(46) 15 12 2003, Бюл. № 12, 2003 р.

(72) Кайдашев Ігор Петрович, Рябенко Вікторія
Вікторівна, Ножинова Оксана Анатолівна(73) Кайдашев Ігор Петрович, Рябенко Вікторія
Вікторівна, Ножинова Оксана Анатолівна

(57) Спосіб корекції апоптозу тимоцитів, що включає вплив фармакологічних речовин та морфологічну оцінку їх дії, який відрізняється тим, що як джерело тимоцитів беруть тимоцити свиней, а як фармакологічну речовину використовують тканинні пептиди з високою біологічною активністю, вплив яких триває 24 год., а додаткову оцінку апоптозу здійснюють шляхом визначення р53 та bcl-2

Винахід стосується галузей біології і медицини та може бути використаний для фармакологічної корекції функціонального стану імунної системи людини при патологіях, що супроводжуються порушеннями протікання апоптотичних процесів.

Апоптоз є універсальним явищем, пов'язаним з розвитком та функціонуванням імунної системи. В останні роки визнано, що багато патологічних процесів, таких, як імунodefіцити, в тому числі СНІД, аутоімунітет, рак, гострі та хронічні запальні процеси, травматичні і стресорні пошкодження тканин, лімфопроліферативні і нейродегенеративні захворювання пов'язані з порушенням регуляції апоптозу [Кайдашев І.П. Апоптоз - как общебиологический процесс // Проблемы экологии и медицины - 1998 - Т.2, №5 - С.9-13. Ярилин А.А. Апоптоз. Природа феномена и его роль в целостном организме // Патол. физиол. и эксперим. терапия, - 1998 - №2 - С.38-35. Ковальчук Л.В., Павлюк А.С., Каспаров А.А., Щигленко Н.А. и соавт. Анализ фармакологических средств на модели апоптоза лимфоцитов человека in vitro в норме и при иммунопатологии // Аллергология и иммунология - 2000 - Т.1, №2 - С.24-30].

Природним явищем в тимусі є апоптоз тимоцитів в процесі дозрівання, який відбувається під контролем розпізнавання молекул Головного комплексу гістосумісності та ендогенних пептидів [Влияние гиперлипидемии на чувствительность тимоцитов к апоптозу у мышей линии СВА и С57В1/8]. Киселева Е.П., Пузырева В.П., Огурцов Р.П., Ковалева И.Г. // Бюл. эксперим. биол. и мед. - 2000 - Т.130, №8 - С.200-202], та регулюється дією фізіологічних концентрацій гормонів надниркових залоз і гормонами тимуса [Besedovsky H.O.,

del Rey A. Immune-neuroendocrine interactions: facts and hypotheses // Endocrine reviews - 1996 - Vol.17, №1 - P.64-102].

Відомі спроби впливу на апоптоз тимоцитів за допомогою амінокислот, цитокінів ФНО- α [Никонова М.Ф., Тверскова Н.В., Ярилин А.А. Влияние фактора некроза опухолей на жизнеспособность и пролиферативную активность тимоцитов // Иммунология - 1991 - №3 - С.29-33. Предотвращение N-ацетил-L-цистеином апоптоза тимоцитов, вызванного УФ-облучением/ Долгачев В.А., Афанасьев В.Н., Долгачева Н.Н., Печатиных В.А. // Иммунология - 2000 - №4 - С.37-38].

У клініці широко використовуються глюкокортикоїди з метою корекції імунопатології завдяки їх здатності активізувати процеси апоптозу імункомпетентних клітин [Дранник Г.Н., Гриневич Ю.А., Дзизик Г.М. Иммуноотропные препараты - Киев "Здоров'я" - 1994 - 288с]. Проте іноді необхідне обмеження антипроліферативної дії глюкокортикоїдів, яке можливо досягти з допомогою фармакологічних речовин.

Найбільш близьким до способу, що заявляється є використання каталази - фермента-антиоксиданта [Персиянова В.О., Вольский Н.Н., Гребенщиков А.Ю., Козлов В.А. Участие активированных метаболитов в индуцированном глюкокортикоидами апоптозе тимоцитов мыши // Иммунология - 1998 - №5 - С.44-46], який знижує концентрацію активованих кисневих метаболітів, що можуть опосередковувати глюкокортикоід-індукований апоптоз імункомпетентних клітин.

Для здійснення цього способу тимоцити 3-4 місячних мишей-самців лінії (CBAxH57B1)F1 куль-

(13) A

(11) 62121

(19) UA

тивували при 37°C в 96-луночних круглодонних планшетах (4x10⁵ клітин на лунку) в середовищі RPMI 1640 з додаванням 5% фетальної телячої сироватки, 2мМ глутаміна і 80мкг/мл гентаміцину. Апоптоз індукували внесенням в культивуальне середовище дексаметазона фосфата (KRKA, Словенія) в кінцевій концентрації 100мМ (10⁻⁴М). Для видалення із середовища культивування H₂O₂, що утворюється в процесі життєдіяльності клітин, в частину лунок додавали каталазу ("Serva") в дозі 500Од/мл. Через 12год культивування кількість життєздатних клітин в культурах визначали стандартним методом з трипановим синім. Фрагментацію ДНК в клітинах через 8год після індукції в них апоптоза дексаметазоном оцінювали загальноприйнятим методом, використовуючи електрофорез клітинних гомогенатів в агарозному гелі. Гелі фарбували бромистим етідієм і фотографували.

Через 12год культивування визначали кількість життєздатних тимоцитів в культурах стандартним методом з трипановим синім. Фрагментацію ДНК після індукції апоптоза дексаметазоном оцінювали, використовуючи електрофорез клітинних гомогенатів в агарозному гелі.

Було відмічено зниження відсотку життєдіяльності тимоцитів в тесті з трипановим синім, фрагментацію ДНК під дією дексаметазону. Індукція апоптоза дексаметазоном знімалася ферментом каталазою, що супроводжувалося зростанням числа життєздатних тимоцитів.

Суттєвими недоліками цього методу є:

1 Використання тимоцитів миші для інтерпретації результатів апоптозу тимоцитів у людини сумнівне, у зв'язку з віддаленістю генетичної спорідненості.

2 Оцінка життєздатності клітин за допомогою трипанового синього не дозволяє диференціювати мертві клітини з урахуванням некрозу чи апоптозу.

3 Відсутність стандартизації часу інкубації тимоцитів (8год для оцінки фрагментації ДНК і 12год для визначення життєдіяльності) обумовлює неможливість співставлення результатів, що стосуються різних стадій апоптозу.

4 Використання методу електрофоретичної фрагментації ДНК для висвітлення антиапоптотичної дії речовини не завжди ефективне і достатнє у зв'язку з тим, що глюкокортикоїд-індукована фрагментація часто не відмінюється блокуючими апоптоз факторами.

5 Інгибування дексаметазонового апоптозу тимоцитів каталазою направлено на активізацію антиоксидантної системи клітини, що є важливим, але не єдиним в антиапоптотичному захисті від дії глюкокортикоїдів.

6 Використання каталази з метою інгибування апоптозу обмежене внаслідок нестійкості ферментів, обмеженого часу їх активності та можливості впливу інактивуючих агентів.

7 Метод передбачає інгибування дексаметазон-індукованого апоптозу тимоцитів, але не дозволяє впливати на апоптоз тимоцитів, викликаний іншими фармакологічними речовинами.

В основу винаходу поставлено завдання створити спосіб корекції апоптозу тимоцитів шляхом удосконалення відомого способу досягти регуляції апоптозу тимоцитів на базальному рівні та забез-

печити ефективний захист від фармакологічно-індукованого апоптозу тимоцитів.

Поставлене завдання вирішують створенням способу корекції апоптозу тимоцитів, який відрізняється тим, що в якості фармакологічної речовини використовують тканинні пептиди тимусу (тималін) і пептидний комплекс нирок (ПКН) з високою біологічною активністю, які модулюють апоптоз в залежності від вихідного стану клітин, що забезпечує підвищену ефективність даного способу.

Перевагами способу, що заявляється є:

1 Дозволяє модулювати процеси апоптозу інтактних тимоцитів на базальному рівні.

2 Забезпечує захисну дію пептидних речовин при апоптозі, викликаному дексаметазоном, форболовим ефіром, іоноформом, ЕДТА, ВАРТА та теофіліном.

3 Універсальність та ефективність антиапоптотичної дії тканинних пептидів при різних способах індукції процесу, що пов'язано з епігенетичним механізмом впливу на ген виживання bcl-2.

4 Відсутність необхідності додаткового застосування антиоксидантів, у зв'язку з наявністю антиоксидантних властивостей у продукту гену bcl-2.

5 Використання препаратів тканинних пептидів в мікродозах, що обумовлено їх високою біологічною активністю.

6 Вибір тимоцитів свиней породи Полтавська біла як об'єкта дослідження дозволяє наблизити результати досліджень до людини.

7 Комплексна оцінка процесів апоптозу із застосуванням специфічних морфологічних методів дослідження апоптозу (фарбування Hoechst 33342 та за Май-Грюнвальд-Романовським-Гімза) забезпечує надійність візуальної оцінки процесу.

8 Використання імуноцитохімічного методу дослідження апоптозу з урахуванням факторів ініціації та регулювання процесу (вивчення CD95, p53, bcl-2).

9 Стандартизація часу інкубації (24год) дає змогу співставляти результати морфологічних та молекулярно-генетичних досліджень на однаковому етапі розвитку процесу, дозволяє вивчати вплив пептидів на завершальні етапи розвитку апоптозу.

Спосіб здійснюють слідуючим чином. Тимус свиней породи Полтавська біла відбирали в асептичних умовах і готували суспензію тимоцитів (4-7x10⁶ клітин/1мл) із гомогенату тканини тимусу в забуференому фізіологічному розчині pH7,2-7,4, яку одержували шляхом механічної дезагрегації. Для лізису еритроцитів суспензію обробляли розчином АСТ (0,16М NH₄Cl та 0,17М TrisOH у співвідношенні 9:1) при +37°C 5 хвилин. Після відмивання в 3ФР при 1500об/хв протягом 5 хвилин, клітини ретельно ресуспендували. Після підрахунку життєздатних клітин у тесті з трипановим синім, суспензію культивували в середовищі RPMI-1640 з додаванням 10% телячої сироватки та антибіотику гентаміцину 100мкг/мл в центрифужних пробірках при 37°C у вологій атмосфері з 5% CO₂. У першій серії дослідів вивчали протікання процесів апоптозу у інтактних тимоцитів в середовищі культивування. У другій та третій серії пептидний комплекс тимусу - тималін та пептидний комплекс нирок вно-

сили до суспензії клітин в кінцевих концентраціях 0,12мкг/мл. В четвертій серії дослідження апоптозу тимоцитів в умовах модуляції внутрішньоклітинних регуляторних систем, проводили шляхом обробки клітин з допомогою фармакологічних речовин відповідно дексаметазону, кальцієвого іонофору, форболового ефіру, EDTA, ВАРТА та теофіліну. З метою дослідження впливу пептидних комплексів тимусу і нирок на розвиток апоптозу при модуляції внутрішньоклітинних регуляторних систем, на клітини, оброблені відповідним із вищезазначених агентів, діяли тималіном або пептидним комплексом нирок в кінцевих концентраціях 0,12мкг/мл. Інкубація була стандартизована і становила 24 години.

З метою комплексної оцінки процесів апоптозу тимоцитів, було використано морфологічні (Фар-

бування за Май-Грюнвальд-Романовським-Гімза та Hoechst 33342), молекулярно-біологічні (імуно-цитохімічне визначення CD95, bcl-2, p53) та біохімічні методи (електрофоретичне дослідження ядерної ДНК).

Нами були досліджені процеси апоптозу тимоцитів за фізіологічних умов і при модуляції активності їх внутрішньоклітинних регуляторних систем.

Експериментальні дані свідчать про те, що за фізіологічних умов в тимоцитах існує базальний рівень апоптозу, який може бути пов'язаний з фізіологічною загибеллю клітин в процесі негативної селекції. Показано, що тимоцити інтактної серії при культивуванні *in vitro* мають базальний рівень апоптозу у вигляді морфологічних ознак фрагментації ядра і конденсації хроматину (таб 1, 2, 3).

Таблиця 1

Зростання морфологічних проявів апоптозу тимоцитів з коефіцієнтом bcl-2/p53=1,3 під дією пептидних комплексів тимусу (тималіна) і нирок

Групи впливу	Фарбування Май-Грюнвальд-Романовський-Гімза	
	% Фрагментації	% Конденсації
Інтакт	3,2±0,45	9,5±1,2
Тималін 0,12 мкг/мл	5,6*±0,3	14,5*±1,3
ПКН 0,12 мкг/мл	4,8±0,5	13,0*±1,1

Тут і надалі n=6 Примітка * - p<0,05 в порівнянні з інтактною групою

Таблиця 2

Зменшення морфологічних проявів апоптозу тимоцитів з коефіцієнтом bcl-2/p53=5,0 під дією пептидних комплексів тимусу (тималіна) і нирок

Групи впливу	Фарбування Май-Грюнвальд-Романовський-Гімза	
	% Фрагментації	% Конденсації
Інтакт	9,0±0,073	11,0±0,57
Тималін 0,12мкг/мл	6,7*±0,7	8,5*±0,3
ПКН 0,12мкг/мл	5,58*±0,3	7,0*±0,6

Таблиця 3

Відсутність змін морфологічних проявів апоптозу тимоцитів з коефіцієнтом bcl-2/p53=1,6 під дією пептидних комплексів тимусу (тималіна) і нирок

Групи впливу	Фарбування Май-Грюнвальд-Романовський-Гімза	
	% Фрагментації	% Конденсації
Інтакт	10,8±1,0	14,0±0,98
Тималін 0,12 мкг/мл	12,0±0,85	11,6±1,4
ПКН 0,12 мкг/мл	8,3±0,73	15,3*±1,0

Ці процеси відбуваються в умовах коекспресії проапоптотичних факторів CD95, p53 та антиапоптотичних таких, як bcl-2. Тимоцити інтактної серії відрізняються коефіцієнтом співвідношення bcl-2/p53, що характеризує стійкість до апоптозу.

Вивчення дії тималіну і ПКН в кінцевих концентраціях 0,12мкг/мл на інтактні клітини показали гетерогенність реакції тимоцитів на пептиди: зростання, зниження апоптозу або відсутність реакції (таб 1, 2, 3). Пептидні комплекси тимусу (тималін) та нирок здатні до зменшення інтенсивності про-

цесів апоптозу внаслідок індукції гену bcl-2 у тимоцитів з вихідною високою стійкістю до апоптозу (таб 2) та сприяють росту інтенсивності апоптозу у тимоцитів з низькою стійкістю до апоптозу (таб 1). В деяких випадках пептиди проявляють толерантну дію (таб 3).

Таким чином, пептидні комплекси здатні вибірково регулювати апоптоз тимоцитів за фізіологічних умов в залежності від генетично обумовлених факторів вихідного стану клітини, а саме стійкості до апоптозу на базальному рівні та, можливо, сту-

пеня генетичної спорідненості між тваринами-донорами тимоцитів та особин, з яких одержано препарати пептидних комплексів

В наших дослідженнях було показано, що поліпептидний комплекс тимусу - тималін та пептидний комплекс нирок в дозі 0,12мкг/мл ефективно перешкоджають розвитку апоптотичних реакцій тимоцитів, викликаних дексаметазоном, активацією протеїнкінази С, підвищенням рівня цАМФ, в умовах перерозподілу внутрішньоклітинного кальцію під дією іонофору та кальцій хелатуючих речовин, шляхом зниження рівня експресії CD95 та підвищення експресії bcl-2

Внаслідок індукції гену bcl-2 та зростання при цьому показника стійкості до апоптозу, тканинні пептиди виступають ефективними та універсальними протекторами від апоптозу тимоцитів в умовах модуляції внутрішньоклітинних регуляторних систем

Результати досліджень, проведені запропонованим методом, дозволяють зробити висновок про високу ефективність використаних пептидних комплексів тимусу (тималіна) та нирок в аспекті регуляції процесів апоптозу тимоцитів в залежності від вихідного стану клітини, як за фізіологічних умов, так і при модуляції їх внутрішньоклітинних регуляторних систем