УДК 615.451.16::581.45:54.02:54-116

И.В. Трутаев

Национальный фармацевтический университет

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ СИНТЕТИЧЕСКИХ ОЛИГОПЕПТИДОВ НА МОДЕЛИ СВОБОДНОЖИВУЩЕЙ ИНФУЗОРИИ-ТУФЕЛЬКИ PARAMECIUM CAUDATUM

В экспериментальную и клиническую фармакологию всё активнее внедряются природные олигопептиды и их синтетические аналоги и модификаты. С учетом недостаточной изученности синтетических олигопептидов (седатина, тимогена, неогена) в фармакологии и медицине и почти полное отсутствие сведений о них в ветеринарной науке целью работы стала оценка интегрированного действия препаратов на живую клетку. Для этого использована модель свободноживущей инфузории-туфельки Paramecium caudatum. Токсическое действие на одноклеточных оценено по двум параметрам: дозозависимому и временному.

Результаты исследований показали, что на клеточном уровне синтетические ди-, три- и пентапептиды практически нетоксичны для биоорганизованной системы.

Ключевые слова: токсичность; синтетические олигопептиды; седатин; тимоген; неоген; модель свободноживущей инфузории-туфельки

ВСТУПЛЕНИЕ

Процесс существования живых функциональных систем носит каскадный характер. Он спускается от экологического до организменного, органного, тканевого, клеточного и внутримолекулярного уровней. И при этом не теряет простых прямых, параллельных и сложных обратных связей. Внутриорганизменная регуляция биологических процессов подчиняется тем же каскадно-возвратным закономерностям. Современная действительность перенасыщена воздействием на организм малофизиологичных и абиотических факторов. Всё вместе взятое ставит организм на предел генетически обусловленных возможностей с постоянным метаболическим напряжением, требующим больших затрат энергии, пластического материала и регуляторных механизмов. Последние включают на молекулярном уровне высокую биологическую активность короткоцепочечных пептидов. В высших интегративных системах они замыкаются нервной и эндокринной регуляцией процессов приспособления к изменяющимся условиям и неблагоприятным воздействиям внешней среды с целью сохранения продуктивного здоровья. В таких стрессогенных условиях поддержание обмена веществ в адаптивном состоянии возможно только при использовании для питания высококалорийных продуктов животного происхождения. А их производство сегодня во всём мире осуществляется с применением фармакологической регуляции биохимических процессов в организме животных и лекарственной защиты их здоровья и продуктивности. При этом принципиальными отличиями ветеринарной фармакологии от гуманной являются два требования. Первое из них — категорическое обеспечение безопасности здоровья человека, потребляющего животноводческую продукцию, получаемую на фоне применения лекарственных средств. И второе — невмешательство, а в крайнем случае минимальное вмешательство в экологический гомеостаз [7, 9, 11].

В таком ракурсе в конкуренцию к синтетическим, антибиотическим, вакцинным препаратам всё активнее входят и занимают свою нишу природные, модифицированные природные фармакологические средства и их синтетические аналоги.

Сегодня к ним относятся препараты: лекарственных растений (женьшень, элеутерококк, золотой корень, лимонник и многие другие); животного происхождения (тканевые препараты, экстракты из органов, индивидуализированные средства типа рантарина, тимолина и ряд других); природные карбоновые кислоты и их модификаты (фумаровая, янтарная, лимонная, яктон и др.); витамины, микроэлементы [5, 7, 8, 10].

© *И.В. Трутаев, 2011*

В экспериментальную и клиническую фармакологию всё активнее внедряются природные олигопептиды животного происхождения, их синтетические аналоги и модификаты

Литературные данные свидетельствуют о низкой токсичности и высокой биологической активности синтетических аналогов природных олигопептидов — седатина, тимогена и неогена. Их используют в микродозах, соизмеримых с гомеопатическими [2, 3, 5, 9].

Однако в ветеринарную медицину они только начинают входить [7, 5]. Учитывая недостаточную изученность синтетических олигопептидов (седатин — аналог концевого пентапептида гормона роста, тимоген — дипептид тимуса, а неоген — трипептид, модифицированный аналог тимогена) в биологии, фармакологии и медицине и почти полное отсутствие сведений о них в ветеринарной науке, целью работы стала оценка интегрированного действия препаратов на живую клетку. Для этого использовали модель свободноживущей инфузории-туфельки Paramecium caudatum.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Известно, что различные виды инфузорий широко используют в биотестировании [4, 6]. Исследования проводили на тест-культурах инфузорий, оценивали интегрированное действие препаратов на живую клетку [1]. Для этого на модели свободноживущей инфузории-туфельки Paramecium caudatum определяли токсичность препаратов, влияние их на выносливость клеток к мембраноповреждающему действию гипертонического раствора хлорида натрия и действие на интенсивность деления парамеций [1, 4, 6].

Исследования проведены в три этапа. На первых двух использованы клетки в стационарной фазе роста, а на третьем — в экспоненциальной [1, 4, 6].

Испытывали 3 вещества: седатин, тимоген и неоген. Изучаемые вещества использовали в концентрациях от 100,0 до 0,01 мг/л с десятикратными разведениями и помещали их в среду с инфузориями, которые находились в стационарной фазе роста. Экспозиция — 24 часа. Затем контрольную группу культур калибровали с гипертоническим раствором натрия хлорида такой концентрации, чтобы достичь 100-ой гибели клеток за 4–5 минут. Достигнутый результат принимали за единицу. Увеличение продолжительности жизни клеток под влиянием препаратов относили к контрольной патологии и выражали в дополнительных к 100% процентах, что отражало защитную активность исследуемых препаратов.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Инфузории являются адекватной моделью для оценки биологической активности веществ, в том числе изучаемых пептидов [1, 4, 6]. С учётом того, что они аналогичны или очень близки к таковым млекопитающего организма, можно было предполагать их индифферентность к инфузориям в пределах допустимых для данного класса соединений соотношений доза–эффект. Однако принципиально новый подход к оценке биологической активности веществ дал возможность не только в целом оценить наличие биологической активности синтетических олигопептидов, но и выявить её особенности в зависимости от состава и последовательности соединений.

Токсическое действие синтетических олигопептидов (седатина, тимогена и неогена) на одноклеточных оценивали по двум параметрам: дозозависимому и временному. В табл. 1 показано, что тимоген и неоген в выбранном диапазоне доз, которые более чем в 10000 раз превосходили лечебную дозу, не оказывают влияния на жизнеспособность инфузорий. Седатин, у которого лечебная доза находилась на том же уровне, проявлял токсическое действие при стократном её превышении, а при десятитысячекратном проявлял полный протистоцидный эффект.

Таблица 1

ДОЗОЗАВИСИМОЕ ДЕЙСТВИЕ ОЛИГОПЕПТИДОВ ПРИ ЭКСПОЗИЦИИ 24 ЧАСА

Пре парат	Содержание препарата в питательной среде, мг/мл					
	0,001	0,01	0,1	1,0	10,0	100,0
Тимоген	–	–	–	–	–	–
Неоген	–	–	–	–	–	–
Седатин	–	–	–	±	±	+

Примечание:
+ — 100% гибель;
± — 50% гибель;
– — отсутствие гибели клеток.

Изучалась динамика прекращения подвижности парамеций (в микроаквариуме их не менее 100) в зависимости от экспозиции их с седатином, введённым в питательную среду в дозе 100,0 мг/мл. Наблюдение за состоянием клеток проводили через 1, 3, 6, 12 и 24 часа. Установлено, что протистоцидное действие седатина нарастает с удлинением времени контакта клеток с препаратом. Гибель 50% инфузорий происходила между 6-м и 12-м часами. Но уже через 1-часовую экспозицию проявлялось действие препарата. Оно выражалось в замедлении броуновского движения отдельных клеток. В после-

дующем их количество возрастало, появлялись клетки без движения. Их число с удлинением экспозиции также возрастало, пока все клетки не прекратили двигаться.

Результаты изучения влияния седатина, тимогена и неогена на выносливость Paramecium caudatum к токсической нагрузке отображены в табл. 2. Полученные данные свидетельствуют (табл. 2), что испытанные олигопептиды независимо от аминокислотного состава и структуры молекулы способствуют повышению сопротивляемости клеток.

Однако установлены существенные различия между препаратами в зависимости от дозы. Практически одинаковый уровень активности проявляли тимоген и неоген, хотя последний по всем соответствующим дозам был активнее своего аналога на 8,0–21,0 %.

Несколько по-другому вел себя седатин. В дозах от 0,001 до 0,1 мг/мл препарат, хотя и менее значительно, чем неоген, повышал сопротивляемость клеток к повреждению. Но в высокой концентрации (0,1 мг/мл) сопротивляемость существенно снижалась на 25,0%. По сравнению с неогеном разница составляла 86,7%. Это, по-видимому, было обусловлено тем, что в этой дозе седатин уже проявлял протистоцидное действие.

Таблица 2

ВЛИЯНИЕ СИНТЕТИЧЕСКИХ ОЛИГОПЕПТИДОВ НА РЕЗИСТЕНТНОСТЬ ПАРАМЕЦИЙ (ЭКСПОЗИЦИЯ 24 ЧАСА)

Препарат	Коэффициент повышения выносливости опытных клеток к контрольным, принятым за единицу, при содержании препаратов в среде, мг/мл			
	0,001	0,01	0,1	1,0
Тимоген	1,20	1,75	1,85	1,25
Неоген	1,45	2,10	2,00	1,40
Седатин	1,30	1,80	1,80	0,75

Результаты изучения влияния синтетических олигопептидов на процесс деления Paramecium Caudatum представлены в табл. 3. На 2–3-й день экспоненциальной фазы роста в питательную среду с клетками добавляли разные концентрации испытуемых препаратов, выдерживали 3-е суток. Затем в соответствии с описанной в методическом пособии методикой в контрольной и в опытных группах рассчитывали коэффициент стимуляции деления парамеций.

Результаты эксперимента показали, что изучаемые синтетические олигопептиды оказывали выраженное стимулирующее влияние на скорость деления инфузорий, находящихся в экспоненциальной фазе роста (табл. 3).

Таблица 3

ВЛИЯНИЕ ОЛИГОПЕПТИДОВ НА ДЕЛЕНИЕ КЛЕТОК P. CAUDATUM

Препарат	Коэффициент стимуляции деления клеток при содержании препаратов в среде, мг/мл			
	0,001	0,01	0,1	1,0
Тимоген	1,65	1,90	2,10	2,20
Неоген	1,70	1,80	2,25	2,20
Седатин	1,80	1,80	1,10	0,60

Препараты повышали интенсивность деления на 65–125% по сравнению с контрольной патологией в основном в зависимости от дозы. Оптимум у неогена и тимогена находился в пределах 0,01–0,1 мг/мл, а у седатина — 0,001–0,01 мг/мл.

В дозе 0,1 мг/мл последний не проявил стимулирующего действия, а затем на 40 % вызвал угнетение деления.

Таким образом результаты исследований доказали, что на клеточном уровне синтетические ди-, три — и пентапептиды практически нетоксичны для биоорганизованной системы. Лишь пентапептид — седатин проявлял в больших концентрациях «усыпляющее» действие на клетки. Оно проявлялось в замедлении, а затем и полном прекращении броуновского движения.

Установлено, что все изучаемые вещества, несмотря на их существенные химические различия, защищали инфузории от мембраноповреждающего действия гипертонического раствора хлорида натрия. Наиболее выраженный эффект был у неогена. В то же время при действии всех препаратов наблюдали характерное снижение валеопозитивного эффекта с резким увеличением концентрации в среде. Это было особенно характерно для седатина и оно коррелировало с его прямым биоугнетающим действием.

На фоне интенсивного размножения клеток доказано, что в очень малых, малых и даже высоких для данного класса соединений дозах (особенно неоген и тимоген) способствовали интенсификации деления клеток в период экспоненции.

Практическое отсутствие токсичности для свободноживущих клеток, высокая защитная активность при повреждении мембран и способствование самым интимным механизмам жизни вида свидетельствуют о том, что синтетические олигопептиды могут стать новейшим поколением ветеринарных фармакологических препаратов для регуляции жизнедеятельности и улучшения здоровья животных.

ВЫВОДЫ

1. Экспериментально доказано, что на клеточном уровне синтетические ди-, три — и пентапептиды практически нетоксичны для биоорганизованной системы.
2. Установлено, что тимоген и неоген в диапазоне доз от 0,001 до 1,0 мг/мл среды не оказывают токсического влияния на жизнеспособность инфузорий. Седатин в дозе 1,0 мг/мл среды проявляет протистоцидный эффект.
3. На инфузориях Paramecium caudatum синтетические олигопептиды в концентрациях до 1,0 мкг/мл в 1,2–2,1 раза способствуют повышению резистентности клеток к повреждающему воздействию и стимулируют деление клеток в экспоненциальной фазе роста.
4. Синтетические олигопептиды (тимоген, неоген и седатин) являются перспективными нетоксичными биологически активными фармакологическими средствами.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ ИНФОРМАЦИИ

1. Бузлама В.С. Экспресс-биотест. Биологический мониторинг экологических систем: [метод. реоменд. / В.С. Бузлама, Ю.Т. Титов, Г.А. Востроилова и др.]. — Воронеж, 1997. — 11 с.
2. Громова О.А. Структурный анализ и ферментативная антиокислительная активность нейрометаболических препаратов природного происхождения: церебролизина, церебролизата, билобила и актовегина / О.А. Громова, О.М. Панасенко // Микроэлементы в медицине. — 2001. — Т.2., №1. — С. 23–27.
3. Малинин В.В. Механизмы действия синтетических пептидных тимомиметиков: автореф. дис. докт. мед. наук / В.В. Малинин. — С.Пб., 2001. — 35 с.
4. Мещеряков Н.П. Сравнительная экспериментальная фармакология и клиническое применение адаптогенов в ветеринарии: дис. докт. ветер. наук / Н.П. Мещеряков. — Воронеж. — 2004. — 458 с.
5. Трутаев И.В. Липидный обмен у животных и влияние на него синтетического олигопептида седатина / И.В. Трутаев, В.С. Бузлама // Сб. тр.: Современные проблемы ветеринарной терапии и диагностики болезней животных. Матер. юбилейной Междунар. научно-практ. конф. ветеринарных терапевтов и диагностов, посвящ. 90-летию со дня рожд. Кабыша А.А. — Троицк, 17–19 мая 2007. — Троицк, 2007. — С.110–111.
6. Фатеева Л.В. Механизмы стресс-протекторного действия коротких пептидов у крыс разного возраста: дис канд. мед. наук / Л.В. Фатеева. — С.Пб. — 2002. — 144 с.
7. Шахов А.Г. Концепция эколого-адаптационной теории возникновения, развития массовой патологии и защиты здоровья животных в сельскохозяйственном производстве / А.Г. Шахов, В.С. Бузлама, В.Т. Самохин и др. — М.: Росинформагротех, 2000. — 41 с.
8. Birkmayer W. Increased life expectancy resulting from L. Deprenyl addition to Madopar treatment in Parkinson`s disease: a long-term study / W. Birkmayer, J. Knoll, P. Rieder // J. Neurol. Transmiss. — 1985. — Vol. 64. — P. 113–127.
9. Combs C.K., Jonson D.E., Cannady S.B. et al. Identification of Microglian Sygnal Transduction Pathways Mediating a Neurotoxic Response to Amyloidogenic Fragments of beta-amiloid and Prior Proteins / C.K.Combs, D.E. Jonson, S.B. Cannady et al. // J. of Neurosci. — 1999, Vol. 19, №3. — P. 928–939.
10. Wierenga P.K. Enhanced selectivity of hyperthermic purging of human progenitor cells using Goralatide, an inhibitor of cell cycle progression / P.K. Wierenga, M.K. Brenner, A.W. Konings // Bone Marrow Transpl. — 1998. — Vol. 21. — P. 73–78.
11. Zamora R. Comparatovo antioxidant effectiventss of dietary в-carotene, vitamin E, selenium and coenzyme Q in rat erythrocytes and plasma / R. Zamora, F.J. Hidalgo, A.L. Tappel // J. Nutr. — 1991. — Vol. 121, №1. — P. 50–56.

УДК 615.451.16:581.45:54.02:54-116

І.В. Трутаєв

ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНЕ ВИВЧЕННЯ ВПЛИВУ СИНТЕТИЧНИХ ОЛІГОПЕПТИДІВ НА МОДЕЛІ ВІЛЬНОІСНУЮЧОЇ ІНФУЗОРІЇ-ТУФЕЛЬКИ PARAMECIUM CAUDATUM

В експериментальну та клінічну фармакологію все активніше впроваджуються природні олігопептиди тваринного походження, їх синтетичні аналоги і модифікати. Враховуючи те, що синтетичні олігопептиди (тимоген, неоген та седатин) недостатньо досліджені у фармації і медицині та повністю відсутні відомості про них у ветеринарній науці, ми визначили за мету зробити оцінку інтегрованої дії препаратів на живу клітину. Для цього використовували модель вільноіснуючої інфузорії-туфельки Paramecium caudatum. Токсичну дію на одноклітинні оцінювали за двома параметрами: дозозалежному та в залежності від часу.

Таким чином, результати досліджень показали, що на клітинному рівні синтетичні ди-, три — і пентапептиди практично нетоксичні для біоорганізованої системи.

Ключові слова: токсичність; синтетичні олігопептиды; седатин; тимоген; неоген; модель вільноіснуючої інфузорії-туфельки

UDC 615.451.16::581.45:54.02:54-116

I.V. Trutaev

EXPERIMENTAL STUDY INFLUENCE OF SYNTHETIC OLIGOPEPTIDES ON THE MODEL FREE-LIVING PARAMECIUM CAUDATUM

In experimental and clinical pharmacology is increasingly being introduced natural oligopeptides of animal nature and their synthetic analogs and modifiers. Taking into account that synthetic oligopeptides (sedatin, thymogen, Neogene) pharmacology and medicine, and there are not informations about them in veterinary science, evaluation of the integrated action of drugs on living cells has been given. With this aim the model free-living Paramecium caudatum has been used. Toxic effect on the unicellular was evaluated by two parameters: dose-dependent and temporary.

The results of investigations showed that, synthetic di-, tri-and pentapeptide are at the cellular level practically non-toxic to bio-organized system.

Kay words:

Адреса для листування:
61020, г. Харьков, ул. Крылова , 8,
ОАО ХФЗ «Красная звезда»
Тел.: (057) 733-17-58

Надійшла до редакції: