

**Д. В. Шитиков, А. В. Бальва, И. Е. Крылова, И. Н. Пишель,
З. Т. Сафиуллин*, А. Г. Ткаченко***

*Государственное учреждение "Институт геронтологии
им. Д. Ф. Чеботарева НАМН Украины", 04114 Киев
ООО "ENI-SALA", 95026 Симферополь

УВЕЛИЧЕНИЕ ВЫЖИВАЕМОСТИ МЫШЕЙ ЛИНИИ CBA/CA ПОД ВОЗДЕЙСТВИЕМ ПЕПТИДНОГО КОМПЛЕКСА "ENI-SALA 3" (предварительные данные)

Исследования проведены на мышах линии CBA/Ca, которых подразделили на 2 группы: контрольная — животные получали воду, основная — животные получали раствор пептидного комплекса "ENI-SALA 3". Установлено, что эффект препарата отсутствовал у самцов, но повышал выживаемость самок на 27 % по сравнению с контролем. Полученные результаты могут свидетельствовать о геропротекторных свойствах препарата, но механизм его действия нуждается в дальнейшем исследовании.

Ключевые слова: биопептидные регуляторы, продолжительность жизни.

Новым подходом к проблеме профилактики и лечения возрастных заболеваний, а также восстановления нарушенных функций организма является биорегулирующая терапия, которая основана на применении эндогенных пептидных биорегуляторов — пептидных комплексов [7]. Известно, что пептиды часто имеют достаточно специфичные функции, являясь гормонами, нейромедиаторами или факторами роста [14, 17, 18]. В организме млекопитающих пептиды могут продуцироваться разными способами, в том числе деградацией белков протеасомами или протеолитическими ферментами, а также специфическим синтезом. Особый интерес представляют собой тканеспецифические пептиды, которые выполняют роль медиаторов трансдукции сигнала в эндокринной, нервной, дыхательной, иммунной и сердечно-сосудистой системах [7].

Практическое применение пептидной регуляции имеет длительную историю. Наиболее известные отечественные ученые, работавшие в

данном направлении исследований, — это академик В. П. Филатов, предложивший термин "тканевая терапия", и академик В. П. Комиссаренко, который разработал пептидный препарат селезенки "Спленин" [1, 3, 6]. Пептидные биорегуляторы (препараты, выделенных из органов и тканей животных) уже длительное время находят применение при различных заболеваниях, патологических состояниях и старении [2, 7]. Экспериментальные и клинические исследования показали, что иммунная защита организма является первой системой, которая нарушается при старении, и пептидные экстракты тимуса и пептиды, выделенные из этих экстрактов, были первыми препаратами, предложенными для коррекции иммунодефицитных состояний [11]. Было установлено, что короткие пептиды, выделенные из различных органов и тканей, а также их синтезированные аналоги (ди-, три-, тетрапептиды) обладают выраженной тканеспецифической активностью как в культуре клеток, так и в экспериментальных моделях у молодых и старых животных [9].

Воздействие пептидов приводит к тканеспецифической стимуляции синтеза белка и усиливает функции тех органов, из которых эти пептиды были выделены (как у молодых, так и у старых животных) [10, 15]. В доклинических исследованиях установлена высокая биологическая активность пептидов. Так, введение пептидов различной природы животным способствовало уменьшению частоты развития опухолей и увеличению средней продолжительности жизни, приводило к снижению уровня глюкозы в крови у животных с экспериментальным сахарным диабетом и повышению плотности костной ткани, способствовало восстановлению функций клеток бронхиального эпителия и восстановлению функциональной активности клеток миокарда [7].

В настоящее время продолжается исследование пептидных препаратов, выделенных из хрящей, семенников, печени, сосудов, мочевого пузыря, щитовидной железы, а также синтезированных пептидов, регулирующих функцию мозга, сетчатки, иммунной системы, пролиферацию и дифференцировку полипотентных клеток. Эти физиологически активные вещества, безусловно, являются перспективными для создания на их основе новых лекарственных препаратов для биорегулирующей терапии [8].

В нашем исследовании был использован пептидный комплекс "*ENI-SALA 3*" (ООО "*ENI-SALA 3*", Симферополь), содержащий пептиды нескольких типов ткани — печени, селезенки, хряща а также незначительное количество пептидов сосудов, нервной ткани, мышц поросят первого месяца жизни.

Целью данной работы было исследование влияния препарата "Пептидный комплекс *ENI-SALA 3*", обладающего широкой тканевой специфичностью, на выживаемость мышей линии *СВА/Са*.

Материал и методы. Исследования проводили на мышах линии *СВА/Са* разводки питомника ГУ "Институт геронтологии им. Д. Ф. Чеботарева НАМН Украины". Животные в возрасте 11–14 мес по рандомизированному принципу были распределены по клеткам по 4–5 мышей. Мыши содержались при природном освещении. Количество воды

и стандартного лабораторного корма не ограничивалось. Мышей подразделили на 2 группы с учетом пола, возраста и массы тела: животные первой (контрольной) группы получали воду в качестве питья; животные второй (основной) группы получали с питьем водный раствор пептидного комплекса "ENI-SALA 3" на протяжении 16 часов (с 17⁰⁰ до 9⁰⁰ следующего дня), 3 раза в неделю по будним дням (через день) в течение 10 мес. (исследование продолжается). Дозировка препарата была экспериментально подобрана производителем и составила 0,3 мкг/сут [5].

Концентрацию глюкозы в крови определяли натошак утром с использованием глюкометра *On-Call Plus* (*Acon Lab. Inc.*, REF G133-115) и специфических тест-полосок (REF G133-111, Lot 392078). Накануне измерения уровня глюкозы животных пересаживали в чистые клетки во избежание попадания остатков пищи. Кровь в объеме 7–8 мкл отбирали из хвостовой вены в асептических условиях и проводили измерения согласно инструкции к прибору. Учет смертности проводили ежедневно, за исключением выходных дней.

Статистическую обработку данных проводили с использованием *t*-критерия Стьюдента для зависимых выборок. Анализ кривых выживания проводили при помощи *U*-критерия Гехана — Уилкоксона.

Результаты и их обсуждение. Данные исследования приведены в таблице, из которой видно, что через 10 мес после начала хронического воздействия препарата у самцов основной группы имелась тенденция к снижению средней массы тела по сравнению с контрольной группой ($P_{(t)} = 0,093$). В группе самок после 10 мес воздействия препарата средняя масса тела не отличалась от мышей контрольной группы, но было выявлено достоверное снижение значений этого показателя по сравнению с исходными (см. табл.), что может косвенно свидетельствовать об изменении метаболизма животных.

Влияние пептидного комплекса "ENI-SALA 3" на массу тела мышей линии CBA/Ca, г ($M \pm m$)

Показатель	Пол	Контроль	ENI-SALA 3
Начальная масса тела, г	самцы	25,9 ± 0,8 (n = 15)	25,0 ± 1,2 (n = 9)
	самки	23,6 ± 0,5 (n = 37)	23,3 ± 0,4 (n = 42)
Масса тела, через 10 мес, г	самцы	26,8 ± 0,6 (n = 8)	23,7 ± 2,1 (n = 4)
	самки	22,4 ± 0,4* (n = 15)	22,0 ± 0,6* (n = 25)

Примечание: * — $P(t) < 0,05$ по сравнению с начальной массой тела животных данной группы.

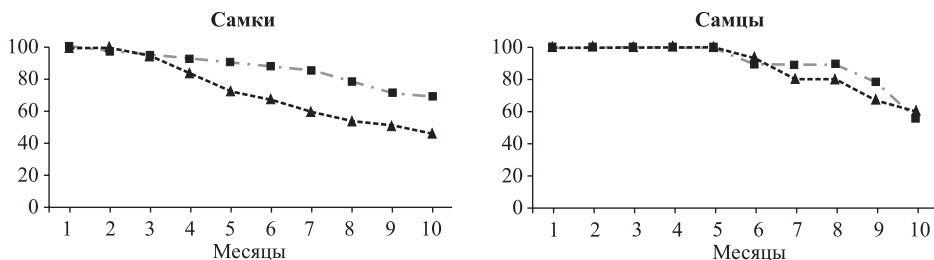
Следует отметить, что пептидный состав раствора зависит от физиологического состояния органа или ткани, а также от многих физических и химических факторов и условий. Каждый вариант такого биологически активного "коктейля" имеет свою направленность действия на клеточный метаболизм ткани. Нами были получены пептидные комплексы, которые

способны запускать процессы внутриклеточной регенерации. Известно, что геропротекторный эффект при использовании пептидных комплексов может быть связан с процессами клеточной регенерации [4, 7]. Нормализация количества и качества внутриклеточных органелл (особенно митохондрий), а также строения клеточных мембран с их транспортными механизмами и рецепторным аппаратом в конечном счете может обуславливать восстановление физиологического функционирования клеток стареющего организма. Однако данный механизм является гипотетическим и нуждается в экспериментальном подтверждении.

В нашем исследовании установлено, что у самок, получавших пептидный комплекс "ENI-SALA 3", через 10 мес достоверно снижается масса тела. В то же время, известно, что снижение массы тела при голодании связано с повышением гомеостаза глюкозы, со снижением инсулинорезистентности и способно индуцировать увеличение продолжительности жизни мышей [12].

Для проверки предполагаемого механизма действия препарата мы использовали простой, но все же значимый показатель — уровень глюкозы в крови. Известно, что уровень глюкозы у людей повышается с возрастом [15], коррелируя с развитием сахарного диабета 2 типа, сердечно-сосудистой патологией и увеличением риска смертности [13]. В нашем эксперименте было установлено, что через 10 мес хронического воздействия наблюдается тенденция к увеличению концентрации глюкозы в крови животных, получавших препарат: самки — $(2,92 \pm 0,11)$ ммоль/л, самцы — $(3,23 \pm 0,26)$ ммоль/л по сравнению с контрольной группой — соответственно $(2,65 \pm 0,11)$ ммоль/л и $(2,85 \pm 0,10)$ ммоль/л. Эта тенденция имеет такую же направленность, которая наблюдается при старении организма, что свидетельствует об отсутствии стабилизирующего действия препарата на значения этого показателя при длительном применении.

Установлено, что более выраженный геропротекторный эффект препарата проявляется у самок — их средняя выживаемость в основной группе была на 27 % выше, чем в контрольной ($P_{(U)} < 0,01$). У самцов разницы в их средней выживаемости между контрольной и опытной группами выявлено не было (рисунок).



Кривые выживаемости Каплана — Мейера самок и самцов мышей линии СВА/Са контрольной группы (сплошная линия) и при хроническом воздействии препарата "ENI-SALA 3" (штрих-пунктирная линия). По оси абсцисс указан период с начала воздействия препарата (нулевая точка).

Полученные результаты могут свидетельствовать о том, что препарат обладает геропротекторным свойством, но механизм его действия нуждается в дальнейших исследованиях.

Причины появления возрастных изменений реакции антистрессорных систем цитозоля и митохондрий клеток скелетных мышц на продолжительную иммобилизацию остаются неясными. Можно предположить существование связи между их появлением и возрастными особенностями эндокринной регуляции антиоксидантной системы и ферментативных систем репарации клеток в условиях стресса, а также особенностями реализации прооксидантных воздействий в различных компартментах мышечной клетки. Их изучению будут посвящены наши дальнейшие исследования.

Список использованной литературы

1. *Комиссаренко В. П.* Спленин. — Киев: Изд-во АН УССР, 1963. — 40 с.
2. *Коркушко О. В., Хавинсон В. Х., Шатило В. Б., Антонюк-Щеглова И. А.* Геропротекторное действие пептидного препарата эпифиза у пожилых больных с хронической ишемической болезнью сердца (результаты лонгитудинального наблюдения) // Пробл. старения и долголетия. — 2012. — **21**, № 3. — С. 347–356.
3. *Логай И. М.* Тканевая терапия по методу академика В. П. Филатова: основные направления и перспективы ее развития // Офтальмол. журн. — 1995. — № 2. — С. 68–73.
4. *Саркисов Д. С.* Очерки по структурным основам гомеостаза. — М.: Медицина, 1977. — 352 с.
5. *Сафиулин З. Т., Ткаченко А. Г.* Перспективы применения препаратов селезенки при бронхолегочной патологии // Астма та алергія. — 2013. — № 1. — С. 38.
6. *Філатов В. П.* Оптична пересадка рогівки і тканинна терапія. — К.: ДМВ, 1948. — 382 с.
7. *Хавинсон В. Х.* Пептидная регуляция старения. — СПб.: Наука, 2009. — 54 с.
8. *Хавинсон В. Х., Анисимов В. Н.* Пептидные биорегуляторы и старение. — СПб.: Наука, 2003. — 223 с.
9. *Хавинсон В. Х., Анисимов С. В., Малинин В. В., Анисимов В. Н.* Пептидная регуляция генома и старение. — М.: РАМН, 2005. — 208 с.
10. *Anisimov V. N., Khavinson V. Kh., Morozov V. G.* Effect of synthetic dipeptide Thymogen® (Glu-Trp) on life span and spontaneous tumor incidence in rats // Gerontologist. — 1998. — **38**. — P. 7–8.
11. *Audhya T., Scheid M. P., Goldstein G.* Contrasting biological activities of thymopoietin and splenin, two closely related polypeptide products of thymus and spleen // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 1984. — **81**, № 9. — P. 2847–2849.
12. *Avogaro A., de Kreutzenberg S. V., Fadini G. P.* Insulin signaling and life span // Pflügers Archiv. — 2010. — **459**, № 2. — P. 301–314.
13. *Basu R., Breda E., Oberg A. L.* et al. Mechanisms of the age-associated deterioration in glucose tolerance: contribution of alterations in insulin secretion, action, and clearance // Diabetes. — 2003. — **52**, № 7. — P. 1738–1748.
14. *Ivanov V. T., Karelin A. A., Yatskin O. N.* Generation of peptides by human erythrocytes: facts and artifacts // Biopolymers. — 2005. — **80**, № 2–3. — P. 332–346.
15. *Khavinson V. Kh., Goncharova N., Lapin B.* Synthetic tetrapeptide epitalon restores disturbed neuroendocrine regulation in senescent monkeys // Neuroendocrinology Lett. — 2001. — **22**. — P. 251–254.

16. Ko G. T. C., Wai H. P. S., Tang J. S. F. // *Croat. Med. J.* — 2006. — **47**. — P. 709–713.
17. Merchant J. L. Tales from the crypts: regulatory peptides and cytokines in gastrointestinal homeostasis and disease // *J. Clin. Invest.* — 2007. — **117**, № 1. — P. 6–12.
18. Mookherjee N., Hancock R. E. W. Cationic host defense peptides: Innate immune regulatory peptides as a novel approach for treating infections // *Cell. Mol. Life Sci.* — 2007. — **64**. — P. 922–933.

Поступила 25.11.2013

**ЗБІЛЬШЕННЯ ВИЖИВАНОСТІ МИШЕЙ ЛІНІЇ CBA/CA
ПІД ВПЛИВОМ ПЕПТИДНОГО КОМПЛЕКСУ "ENI-SALA 3"
(попередні дані)**

**Д. В. Шитіков, О. В. Бальва, І. Є. Крилова, І. М. Пішель,
З. Т. Сафіуллін*, О. Г. Ткаченко***

Державна установа "Інститут геронтології
ім. Д. Ф. Чеботарьова НАМН України", 04114 Київ
*ТОВ "ENI-SALA", 95026 Сімферополь

Дослідження проведені на мишах лінії CBA/Ca, яких підрозділили на 2 групи: контрольна — тварини одержували воду, основна — тварини одержували розчин пептидного комплексу "ENI-SALA 3". Установлено, що ефект препарату був відсутній у самців, але підвищував виживаність самок на 27 % у порівнянні з контролем. Отримані результати можуть свідчити про геропротекторні властивості препарату, але механізм його дії має потребу в подальшому дослідженні.

**INCREASE OF SURVIVAL RATE OF CBA/CA MICE BY
PEPTIDE COMPLEX "ENI-SALA 3" (preliminary data)**

**D. V. Shitikova, A. V. Balva, I. E. Krylova, I. N. Pishel,
Z. T. Safiullin*, A. G. Tkachenko***

State Institution "D. F. Chebotarev Institute of Gerontology
NAMS Ukraine, 04114 Kyiv
* "ENI-SALA" Ltd., 95026 Simferopol

Experiments were performed on CBA/Ca mice divided in two groups: control — animals received water, and experimental — animals received a solution of peptide complex "ENI-SALA 3". Compared to control animals, the results obtained showed no effect of the preparation in the males, but increased survival rate in the females by 27 %. This may signify geroprotecting properties of the preparation, but the mechanism of its effect needs further studies.

Сведения об авторах

ГУ "Институт геронтологии им. Д. Ф. Чеботарева НАМН Украины"

Лаборатория патофизиологии и иммунологии

Д. В. Шитиков — м.н.с.

А. В. Бальва — м.н.с.

И. Е. Крылова — м.н.с.

И. Н. Пишель — гл.н.с., д.м.н. (iryna.pishel@gmail.com)

ООО "ENI-SALA"

З. Т. Сафиуллин — генеральный директор

А. Г. Ткаченко — директор