

Л.В. Гарманчук, О.М. Макаренко, Н.М. Храновська, Т.В. Ніколаєнко,
В.В. Нікуліна, Х.Д. Непийвода, Л.І. Остапченко, С.Г. Морозов, М.С. Косіцин

Мітокоректин стимулює ангиогенез *in vitro*

*Досліджували вплив мітокоректину (комплекс нативних олігопептидів, отриманих з мозку новонароджених свиней) на культуру ендотеліальних клітин. Показано, що засіб концентраційнозалежно індукує ангиогенез *in vitro*. За результатами МТТ-тесту та підрахунку клітин у камері Горяєва виявлено мітогенний ефект мітокоректину в концентраціях 0,1–1 мг/мл, який полягає в збільшенні кількості клітин на 25 % ± 5 %, а також зростанні субпопуляції клітин проліферативного пулу (G₂/M+S) в 1,8 рази в розведеннях мітокоректину від 0,01 до 0,05 мг/мл порівняно з контролем. На 3D-культурі клітин і в стаціонарному рості зафіксовано ефекти, що вказують на індукцію мітокоректином диференціювання ендотеліальних клітин: зниження продукції NO, підсилення метаболізму глюкози та формування капілярноподібних структур.*

Ключові слова: мітокоректин, ангиогенез, ендотеліальні клітини.

ВСТУП

Вивчення різних засобів ефективного лікування інфекційно-запальних ускладнень інсульту залишаються актуальними. Відновлення ішемічного вогнища переважно залежить від функціонального стану багатьох органів і тканин [1, 3]. Важливою складовою лікування ішемічної хвороби є нормалізація васкуляризації, яка порушується внаслідок гіпоксії [8]. За нормальних умов гіпоксія, як вважають, виступає тригером проліферації клітин судинного ендотелію, і відновлення кровопостачання здійснюється індукцією проангіогенними факторами васкуляризації, але при патологічному стані цей процес порушується [10, 15]. Тому ендотеліальні клітини – одна з перспективних мішеней терапії таких захворювань.

Мітокоректин є засобом довільного вибору при комплексній терапії ішемічних захворювань [6]. Вибір препарату в лікуванні зумовлений його відновними властивостями. Так, мітокоректин в умовах гіпоксії підсилює компенсаторну швидкість аеробного гліколізу, модулює активність мембранозв'язаних

ферментів, рецепторних комплексів, що посилюють їх здатність зв'язуватися з лігандами, сприяє покращенню транспорту нейромедіаторів і синаптичної передачі, активації енергогенеруючої функції мітохондрій [7]. Незважаючи на це, вплив мітокоректину на ендотеліальні клітини не вивчено.

Метою нашої роботи було дослідження механізму дії мітокоректину на клітини судинного ендотелію в системі *in vitro*.

МЕТОДИКА

Діючою речовиною мітокоректину [6] є комплекс олігопептидів (з молекулярною масою до 10 000 Да) і амінокислот, виділених з мітохондрій клітин печінки, мозку та підшлункової залози (у співвідношенні 10:10:1) однодобових порослят, народжених у гіпоксичних умовах. Вміст пептидів з молекулярною масою від 1500 до 6000 Да становив 18 %, менше 1500 Да – близько 60 %, а вільних амінокислот – не перевищував у середньому 10 %. Серед пептидів переважали речовини з молекулярною масою близько 1250–1350, 1180, 1070, 680, 370 Да. Всі експерименти з їх

отримання проводили відповідно до правил гуманного поводження з тваринами [9].

Для оцінки про- і антиангіогенного впливу мітокоректину були використані ендотеліальні клітини аорти свині (РАЕ), люб'язно надані проф. Лондонського університету І. Гутом. Клітини інкубували в середовищі DMEM («Sigma», США) та 10 % ембріональної телячої сироватки («Sigma», США) при 37 °С, в умовах 5% CO₂ та 100 % вологості в 96-лункових планшетах («Nunc», Данія). Мітокоректин розчиняли в середовищі інкубації до кінцевої концентрації 2 мг/мл, стерилізували через нітроцелюлозні шприцеві фільтри (0,22 мкм). Клітини висаджували в кількості 100 тис/мл в об'ємі 100 мкл, препарат додавали в серійних послідовних розведеннях від 0,0001 до 1 мг/мл. Вплив мітокоректину вивчали в декількох паралельних експериментах.

Цитотоксичний/пропроліферативний ефект мітокоректину на культивовані ендотеліоцити визначали з використанням цитофлуориметричного аналізу [13], підрахунком кількості живих і мертвих клітин при фарбуванні трипановим синім (0,25%-й розчин), а також в колориметричному тесті за активністю мітохондріальних дегідрогеназ живих клітин, який базується на їх здатності відновлювати розчинний у фізіологічних буферах 3-[4,5-диметилтіазол-2-іл]-2,5-дифеніл-тетразоліум бромід (МТТ, «Sigma») – сіль жовтого кольору в кристалічній формі фіолетового кольору [11].

Вміст нітрит-аніона (NO₂⁻) та нітрат-аніона (NO₃⁻) визначали колориметричним методом за допомогою реактиву Грісса [5]. Вміст глюкози в середовищі інкубації ендотеліальних клітин під впливом мітокоректину розраховували за глюкозооксидазним методом з використанням стандартного набору реактивів («Філісіт», Україна), як описано нами раніше [12], за формулою:

$$C = 10,0 \cdot E_{\text{досл.}} / E_{\text{кал.}}$$

де: С – концентрація глюкози в досліджуваному зразку, ммоль/л; 10,0 – концентрація глюкози в калібрувальному розчині, ммоль/л;

$E_{\text{досл.}}$ – оптична щільність досліджуваного зразка; $E_{\text{кал.}}$ – оптична щільність калібрувальної проби.

Сумарний адгезивний потенціал під впливом мітокоректину визначали фарбуванням фіолетовим кристалічним клітин, прикріплених до субстрату, як описано нами раніше [4]. Проангіогенну дію мітокоректину на формування капілярноподібних структур (КПС) вивчали, використовуючи 2D і 3D моделі культивування ендотеліальних клітин [2, 14]. Отримані результати фотографували і обробляли за допомогою інвертованого мікроскопа AxioVert з програмним забезпеченням AxioVision («Zeiss», Німеччина).

Статистичну обробку результатів проводили з використанням програми «Origin 6,1» і критерію t Стьюдента. Всі результати приведені у вигляді середніх арифметичних і стандартних відхилень.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

У результаті комплексного дослідження було виявлено, що вплив мітокоректину на культивовані ендотеліальні клітини лінії РАЕ залежить як від його концентрації, так і від часу дії на культуру. Після дії мітокоректину в дозі 0,1–1 мг/мл на ендотеліоцити протягом 24 год було виявлено їх збільшення на 25 % ± 5 % порівняно з контролем (рис. 1).

Співвідношення живих і мертвих клітин

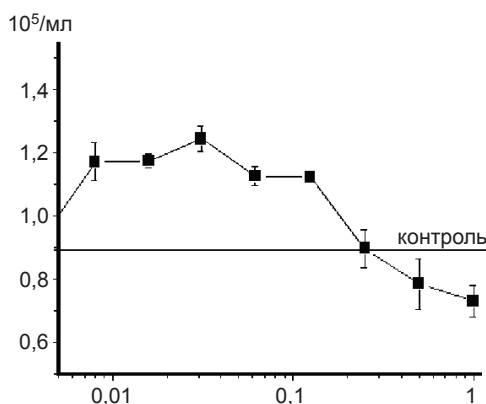


Рис. 1. Вплив мітокоректину протягом 24 год на проліферацію ендотеліальних клітин лінії РАЕ. $P < 0,05$ у порівнянні з контролем (без препарату)

не залежало від концентрації мітокоректину у середовищі інкубації, і виживання було вище в середньому в 1,3 раза відносно відповідного контролю (5–7 % у зразках з мітокоректином порівняно з 11,5 % у контролі). Кількість апоптотичних клітин після впливу препарату також була меншою, ніж у контролі (8–12 % щодо 15 % у контролі).

За результатами цитофлуориметричного аналізу виявлено збільшення популяції проліферативного пулу клітин під впливом мітокоректину (0,01–0,05 мг/мл) в 1,8 раза ($P < 0,01$), в той час як у більш високих концентраціях (0,1–1 мг/мл) змін у клітинному циклі ендотеліоцитів у порівнянні з контролем не виявлено (таблиця).

МТТ-тест [11] для клітин експоненційного та стаціонарного росту, що культивувалися з мітокоректином 24 та 72 год відповідно, показав, що активність дегідрогеназ у розрахунку на одиницю клітин була вищою в стаціонарній фазі росту ендотеліоцитів порівняно з експоненційною та відповідними контрольними показниками.

Отже, результати, отримані в трьох функціональних тестах, можуть свідчити про мітогенний потенціал мітокоректину, оскільки збільшувалася популяція клітин проліферативного пулу та зменшувалася кількість апоптотичних клітин. Найбільш виражений мітогенний та антиапоптотичний вплив мітокоректину на ендотеліоцити був при його концентраціях 0,1–1 мг/мл. Таким чином, ці дози можуть бути найбільш терапевтично ефективними для відновлення васкуляризації в постінсультний період [2].

Важливим показником функціонального статусу ендотеліальних клітин є рівень активності ендотеліальної NO-синтази (eNOS). Відомо, що оксид азоту має широкий спектр біологічної дії і характеризується поліфунк-

ціональністю проявів: здатний як посилювати процеси перекисного окиснення ліпідів у мембранах клітин і ліпопротеїдах сироватки крові, так і інгібувати їх, може викликати вазодилатацію та вазоконстрикцію, індукує апоптоз і водночас проявляє захисний ефект стосовно нього, але спричиненого іншими агентами [5]. У наших дослідженнях було показано, що мітокоректин у дискретних концентраціях знижує продукцію NO як в експоненційному (24 год інкубації), так і в стаціонарному рості клітин (72 год інкубації). Так, 1; 0,1 та 0,001 мг/мл мітокоректину в середовищі інкубації клітин знижує вищевказаний показник в 1,5–1,7 раза ($P < 0,01$), а в стаціонарному рості в концентрації 1 та 0,1 мг/мл – в 2 і 1,5 раза ($P < 0,01$) відповідно (рис. 2), що підтверджує попередні результати визначення кількості апоптотичних клітин. Нами було показано, що мітокоректин знижує їх вміст внаслідок інгібування продукції NO і, відповідно, одним з механізмів його впливу є антиапоптотичний ефект [18].

Мітокоректин у умовах гіпоксії викликає компенсаторну активацію аеробного гліколізу та зменшує пригнічення окиснювальних

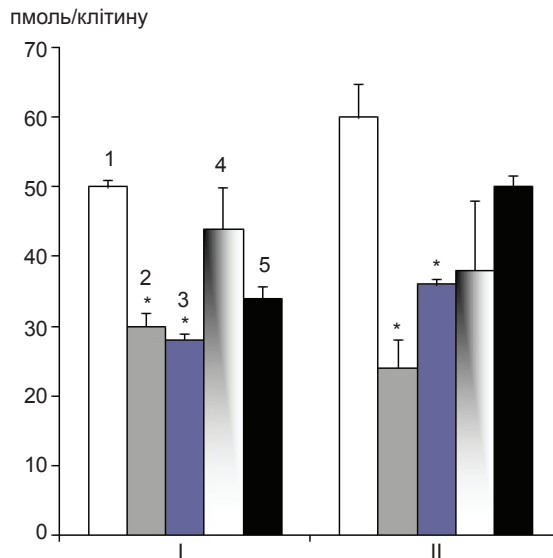


Рис. 2. Залежність продукції NO ендотеліальними клітинами PAEC від концентрації мітокоректину та часу інкубації з агентом: I – 24 год; II – 72 год; 1 – контроль; 2–1 мг/мл; 3–0,1 мг/мл; 4–0,01 мг/мл; 5–0,001 мг/мл мітокоректину відповідно.* $P \leq 0,05$ в порівнянні з контролем

процесів у циклі Кребса з підвищенням вмісту АТФ і креатинфосфату, активацію енергосинтезувальної функції мітохондрій, стабілізацію клітинних мембран [6, 7]. У концентрації мітокоректину 1,0 і 0,5 мг/мл поглинання глюкози клітинами знижується на $44 \pm 1,7$ і $19 \% \pm 2 \%$ ($P < 0,05$) відповідно, тоді як у концентрації 0,02; 0,01 та 0,005 мг/мл – підвищується на $22 \% \pm 3 \%$ ($P < 0,05$) порівняно з контролем (рис. 3).

Отримані результати можуть свідчити про інтенсифікацію метаболізму глюкози під впливом мітокоректину в розведеннях від 0,001 до 0,05 мг/мл, а за більш високих концентрацій (0,1–1 мг/мл) спостерігається протилежний ефект, тобто пригнічення метаболічного перетворення глюкози.

Виявлено також, що для клітин ендотелію транскрипція гена основного транспортера глюкози GLUT1 регулюється серин-треоніновою кіназою Akt1 [16]. Водночас остання асоційована з адгезивними молекулами, тому важливим є визначення сумарного адгезивного потенціалу за кількістю прикріплених до субстрату клітин. Показано 2–4-кратне збільшення кількості адгезивних клітин при

концентрації мітокоректину 0,2–1 мг/мл та їх зменшення при 0,002–0,2 мг/мл у середовищі інкубації клітин.

Одним із найбільш специфічних тестів для оцінки ангиогенезу *in vitro* є здатність ендотеліальних клітин формувати КПС в моделях 2D- та 3D-росту, що є проявом пізньої стадії ангиогенезу – диференціюванням. Ця властивість – їхня автономна характеристика, тобто клітини потребують позаклітинних сигналів, які ініціюють початок формування КПС, але не таких, що контролюють етапи цього процесу [17]. Так, за умов довготривалого культивування клітин лінії PAE в рідкій 2D-культури при дії мітокоректину було зафіксовано більш інтенсивне формування КПС у вигляді ланцюжків (рис.4,б), порівняно з контролем (рис.4,а), що може свідчити про судинний морфогенез. На рис. 4,г продемонстровано явище виходу клітин із 3D-культур та їх радіальна міграція по субстрату, тоді як для контролю характерним є хаотичний рух клітин (див. рис. 4,в). Ендотеліоцити, що виходять за міграційну зону, починають проліферувати, створюючи передумови для більш інтенсивного формування КПС. Зростання проліферативних показників клітин за впливу мітокоректину (0,01–0,05 мг/мл) підтверджено як у МТТ-тесті, так і цитофлуориметричним аналізом (див. таблицю).

Отже, отримані результати показують, що мітокоректин може бути задіяний у двох різних механізмах ангиогенезу: проліферація ендотеліальних клітин з наступною їх диференціацією та стабілізацією.

Таким чином, проведене комплексне дослідження свідчить про те, що мітокоректин проявив позитивну проангіогенну дію відносно культивованих ендотеліальних клітин лінії PAE свині. Це підтверджується зростанням субпопуляції клітин проліферативного пулу

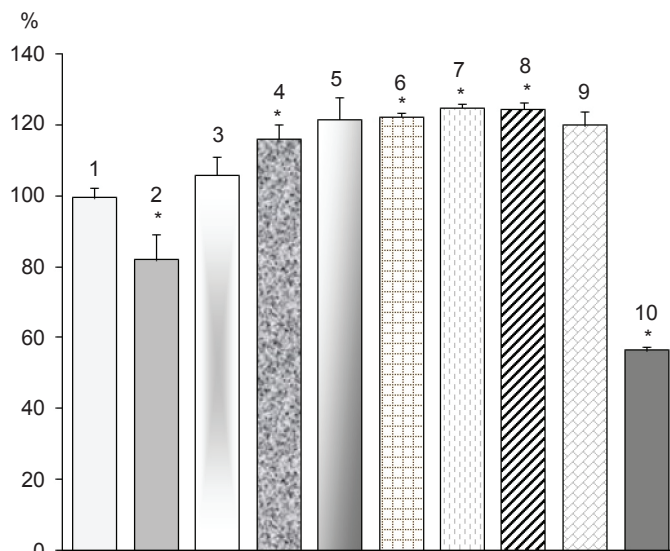


Рис. 3. Вплив мітокоректину на рівень поглинання глюкози клітинами лінії PAE: 1 – контроль; 2 – 1 мг/мл; 3 – 0,5 мг/мл; 4 – 0,2 мг/мл; 5 – 0,1 мг/мл; 6 – 0,05 мг/мл; 7 – 0,02 мг/мл; 8 – 0,01 мг/мл; 9 – 0,005 мг/мл; 10 – 0,001 мг/мл мітокоректину відповідно. * $P \leq 0,01$ порівняно з контролем

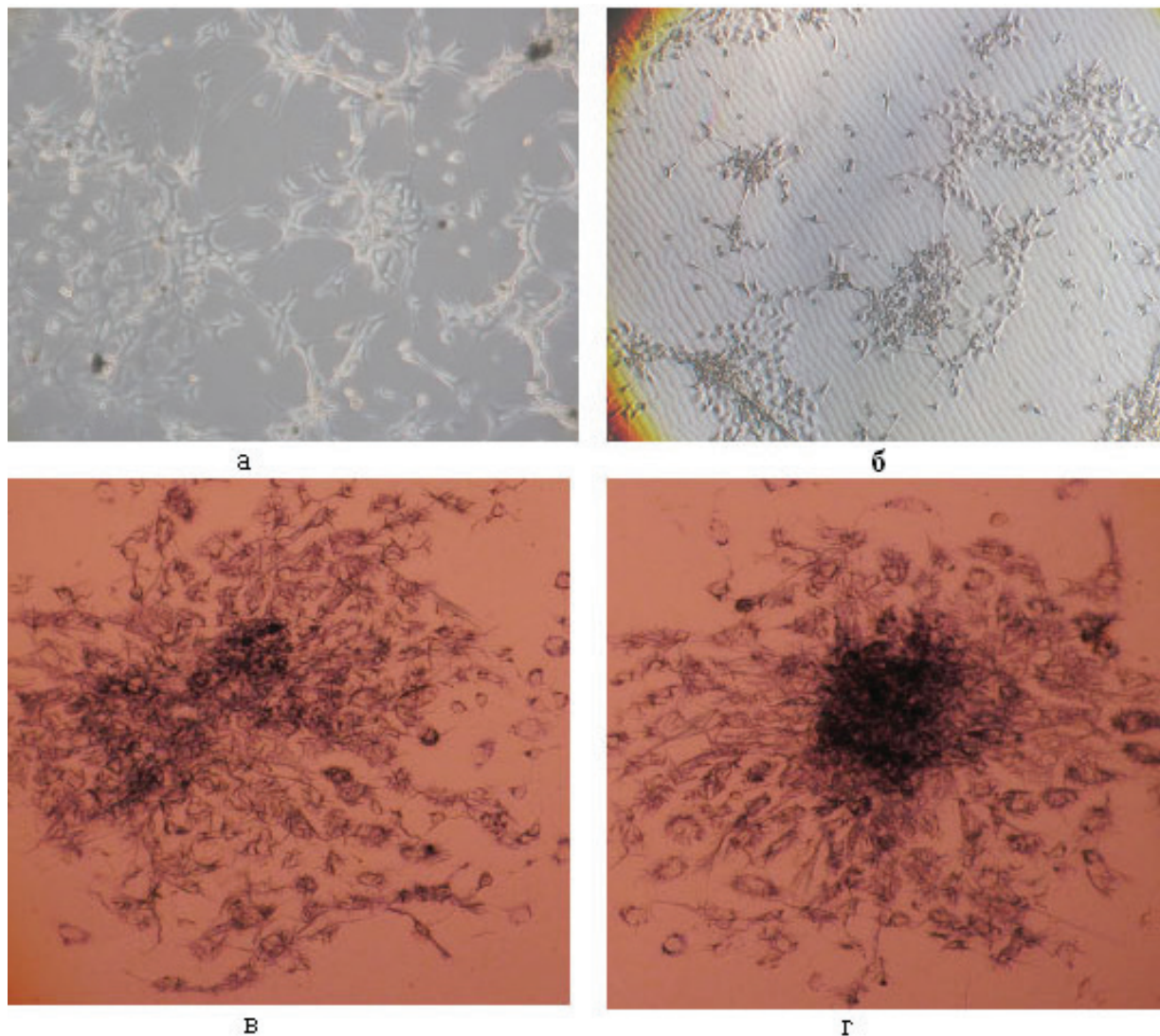


Рис. 4. Міграція клітин лінії PAE по субстрату під впливом мітокоректину: а – контроль для 2D-культури, б – після впливу мітокоректину, в – контроль для 3D-культури, г – після впливу мітокоректину

($G_2/M+S$) порівняно з контролем, зниженням кількості апоптотичних клітин. Також зафіксовано ефекти, що вказують на індукцію мітокоректином диференціювання ендотелі-

Розподіл клітин лінії PAE (%) за фазами клітинного циклу під впливом мітокоректину

Вміст клітин у фазах клітинного циклу	G_0/G_1	G_2/M	S	$G_2/M+S$
Контроль	80,08±1,22	12,14±0,42	7,78±0,26	19,92±0,68
Мітокоректин, мг/мл				
0,01–0,05	65,98±0,41*	19,82±0,31**	13,20±0,87	34,02±1,25*
0,1–1	76,09±0,93	16,84±1,27*	8,08±2,23	23,92±3,21

* $P<0,05$; ** $P<0,01$ порівняно з контролем.

альних клітин: зниження продукції NO, підсилення метаболізму глюкози та формування КПС. Отже, цей препарат може бути досить ефективним засобом відновлення васкуляризації, що є важливим у постінсультний період при ішемічних ускладненнях.

**Л.В. Гарманчук, А.Н. Макаренко,
Н.Н. Храновська, Т.В. Николаенко,
В.В. Нікуліна, Х.Д. Непийвода,
Л.І. Остапченко, С.Г. Морозов, Н.С. Косицин**

МИТОКОРРЕКТИН СТИМУЛИРУЕТ АНГИОГЕНЕЗ IN VITRO

Исследовали влияние митокорректин (комплекс нативных олигопептидов, выделенных из мозга новорожденных свиней) на эндотелиоциты в культуре. Выявлено, что препарат в зависимости от концентрации индуцирует ангиогенез in vitro. Согласно результатов МТТ-теста и стандартного подсчета клеток в камере Горяева показано митогенный эффект митокорректин при 0,1–1 мг/мл, который состоит в увеличении количества клеток на 25% ± 5%, а также субпопуляции клеток пролиферативного пула ($G_2/M+S$) в 1,8 раза в разведениях митокорректин от 0,01 до 0,05 мг/мл относительно контроля. В 3D-культуре клеток и в стационарной фазе роста зафиксировано эффекты, которые указывают на индукцию митокорректин дифференцирования эндотелиальных клеток: снижение продукции NO, усиление метаболизма глюкозы и формирование капилляроподобных структур.
Ключевые слова: митокорректин, ангиогенез, эндотелиальные клетки.

**L.V. Garmanchuk, A.N. Makarenko,
N.N. Khranovskaya, T.V. Nikolayenko,
V.V. Nikulina, K.D. Nepiyvoda, L.I. Ostapchenko,
S.G. Morozov, N.S. Kositsyn**

MITOKORREKTINE STIMULATES ANGIOGENESIS IN VITRO

The effect of mitokorrection (complex native oligopeptides isolated from neonatal pig brain) on endothelial cells in culture was investigated. It was revealed that the drug concentration-dependently induces angiogenesis in vitro. Mitogen effect of Mitokorrection was shown by MTT-test and routine cell count in concentration diapason (0.1–1 mg/ml) which means an increased number of cells by 25±5% and cell subpopulation of proliferative pool ($G_2/M+S$) 1.8 times in concentration diapason mitokorrection (0,01–0,05 mg/ml) in comparison with control. In 3-D culture and in stationary phase we detected induction of differentiation of endothelial cells, a decrease the level of NO production and enhancement of glucose metabolism and stimulation of formation of capillary-like tubes.

Key words: mitokorrection, angiogenesis, endothelial cells.

NSC «Institute of Biology,» Kyiv National Taras Shevchenko University, Kyiv,

National Cancer Institute, Kyiv, Ukraine,

The Institute of Higher Nervous Activity and Neurophysiology RAS, Moscow,

Institute of General Pathology and Pathophysiology RAS, Moscow

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Виленский Б.С. Осложнение инсульта: профилактика и лечение. –С.-П.:Фолиант, 2000. – С. 128.
2. Гарманчук Л.В. Моделирование ангиогенезу in vitro з використанням 3D-культур ендотеліальних клітин // Фізика живого. – 2010. – №3. – С.55–57.
3. Гарманчук Л.В., Храновская Н.Н., Макаренко А.Н., Мазур О.В., Скачкова О.В., Непийвода Х.Д., Лаврова Е.В., Перепелицына Е.М., Сенчило Н.В., Васильева И.Г., Остапченко Л.И. Комплексное исследование иммуномодулирующего влияния препаратов с ноотропным механизмом действия на иммунокомпетентные клетки // Журн. НАМН Украины. – 2011. – 17, № 3. – С. 218–226.
4. Гарманчук Л.В., Перепелицына О.М., Гринюк І.І., Прилуцька С.В., Магішевська О.П., Сидоренко М.В. Вплив фулеренів C_{60} на адгезивні властивості клітин раку молочної залози // Доп. НАН України. – 2009. – №4. – С.164–167.
5. Ивашкин В.Т., Драпкина О.М. Клиническое значение оксида азота и белков теплового шока. – М.:ГЭОТАР Медиа. – 2001. – С.177.
6. Пат. № 2008136321/15 РФ. Лекарственный препарат для лечения гипоксических и токсических митохондриальных нарушений и способ его получения // Макаренко А.Н., Морозов С.Г., Кульчиков А.Е., Широбокова Л.П., Божко А.М. – Опубл. 20.03.2010, Бюл. № 8.
7. Макаренко А.М., Широбокова Л.П., Шаяхметова А.М. Состояние биохимических показателей печени и газообмена у экспериментальных животных в условиях острой нитробензольной интоксикации и коррекции новым интраорганонидным средством мито-хондрином // Токс. вестн. – 2003. – №2. – С.6–9.
8. Asahara T., Murohara T., Sullivan A., Silver M, Van Der Z.R., Li T., Witzenbichler B. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis // Science. – 1997. – 275. – P.964–967.
9. Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. – W.: National Academy of Press, 1996. – P. 140.
10. Folkman J., D'amore P.A. Blood vessel formation: What is its molecular basis? // Cell. – 1996. – 87. – P. 1153–1155.
11. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxic assays // J. Immunol. Methods. – 1983. – 65. – P.55–63.

12. Neryuvoda K., Lavrova K., Garmanchuk L., Ostapchenko L. EGF and herceptin influence on proliferation, adhesion and glucose consumption of tumor cells MCF-7 // Abstracts VIII Parnas conference. – Warsaw, Poland, 2009. – P.7.10. – P.59.
13. Nicoletti I., Migliorati G., Pagliacci M.C., Grignani F., Riccardi C. A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry // J.Immunol. Methods. – 1991. – 139. – P. 271–280.
14. Pauly R.R., Passaniti A., Crow M., Kinsella J.L., Papadopoulos N., Monticone R., Lakatta E.G., Martin G.R. Experimental models that mimic the differentiation and dedifferentiation of vascular cells // Circulation. – 1992. – 86. – P. 11168–11173.
15. Risau W. Differentiation of endothelium // FASEB. J. – 1995. – 9. – P. 926–933.
16. Wei-Lan Yeh, Chun-Jung Lin, Wen-Mei Fu. Enhancement of glucose transporter expression of brain endothelial cells by vascular endothelial growth factor derived from glioma exposed to hypoxia // Mol.Pharm. – 2008. – 73, №1. – P. 170–177.
17. Zhu W.H., Guo X., Villaschi S., Nicosia R.F. Regulation of vascular growth and regression by matrix metalloproteinases in the rat aorta model of angiogenesis // Lab. Invest. – 2000. – 80. – P. 545–555.
18. Ziche M., Morbidelli L., Masini E., S. Amerini, H.J. Granger, C.A. Maggi, P. Geppetti. Nitric oxide mediates angiogenesis in vivo and endothelial cell growth and migration in vitro promoted by substance P // J. Clin. Invest. – 1994. – 94. – P. 2036–2044.

ННЦ “Ін-т біології», Київ. нац. ун-ту ім. Тараса Шевченка,

Нац. ін-т раку, Київ;

Ін-т загальної патології та патофізіології РАН, Москва;

Ін-т вищої нервової діяльності та нейрофізіології РАН, Москва

E-mail: nikolaenkotetiana@yandex.ua

*Матеріал надійшов
до редакції 31.10.2012*