

ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ МЕДИЦИНА

УДК 612.07.1.612.112.94

ГИПОТАЛАМИЧЕСКИЙ ПОЛИПЕПТИД ПОВЫШАЕТ ЭКСПРЕССИЮ ГОРМОНА РОСТА ЧЕЛОВЕКА В КУЛЬТУРАХ ФИБРОБЛАСТОВ МЫШЕЙ BALB/c**В.С.Априкян, С.Г. Чаилян, А.А.Галоян***/Институт биохимии им.Г.Х.Бунятына НАН РА/
375014 Ереван, ул. П.Севака 5/1*

Ключевые слова: гипоталамический полипептид, мышинные фибробласты, гормон роста человека, ELISA-тест

Структурно-функциональные взаимоотношения между центральной нервной и иммунной системами, как известно, осуществляются посредством различных классов регуляторных молекул, включая медиаторы обеих систем [13,17]. В последние годы выделены и охарактеризованы пептиды гипоталамуса, представляющие новое семейство иммуномодуляторов [6–9,14–16]. Они регулируют антителообразование [3,5], клеточно-опосредованные иммунные реакции [4], различные функции макрофагов [5,12], синтез и секрецию цитокинов: интерлейкина-1, интерлейкина-2, интерлейкина-6, фактора некроза опухолей- α [1,2,4,7].

Известно, что в развитии и функционировании иммунной системы важная роль принадлежит гормону роста (ГР) [18]. Показано, что при сниженном его уровне (при карликовости и др. патологиях) имеет место подавление гуморального и клеточного звеньев иммунного ответа [19]. В этой связи интересным представлялось выяснение возможности стимуляции выработки ГР с помощью гипоталамических иммуномодуляторов.

Целью настоящего исследования явилось изучение способности структурально охарактеризованного пролин-богатого полипептида (ПБП) гипоталамуса [9,15] изменять выработку ГР человека в культурах мышинных фибробластов.

Материал и методы

В исследовании использовали ПБП, полученный из фракции низкомолекулярных белков и пептидов гипоталамуса крупного рогатого скота [15]. Изменение экспрессии ГР исследовали в известной экспериментальной модели, включающей линию фибробластов мышей BALB/c [10], стабильно продуцирующую ГР человека. Концентрацию ГР определяли двухсайтным иммунометрическим методом ELISA [11]. Фибробласты мышей (клон 5 BALB/c -ГР) высевали по 4×10^4 клеток в 24-луночные плейты Costar (ICN, США) в питательной среде (ПС) RPMI 1640 (ICN), содержащей 10,0% фетальной телячьей сыворотки (ICN) в объеме 2,0 мл и 100 мкг/мл канамицина (ICN), и инкубировали при 37°C в атмосфере 10,0% CO₂ 3

суток до достижения монослоя. Затем клетки промывали свежей ПС и реинкубировали в тех же условиях еще 1 сутки. Для определения концентрации ГР отбирали по 200,0 мкл содержимого каждой пробы. Проводили сенсibilизацию плейтов Titertek (ICN) при 4°C в течение 12 ч моноклональными антителами (Мон-АТ) против ГР человека (10,0 мкг/мл), полученными в ИМБ РАН, в 0,02 М натрий-карбонатном буфере при pH 9,6 по 50,0 мкл/лунку. После промывки несорбированных Мон-АТ раствором фосфатного буфера (ICN) вносили по 50,0 мкл проб и стандартов, содержащих ГР в различных концентрациях, и инкубировали в течение 1 ч. Затем после трехкратной промывки вносили в лунки кроличьи поликлональные АТ против ГР по 50,0 мкл и инкубировали в течение 1 ч. После последующей трехкратной промывки лунок вносили в них по 50,0 мкл АТ против иммуноглобулинов кролика, меченных пероксидазой хрена (Amersham, США), и инкубировали в течение 1 ч. Затем сливали содержимое лунок, многократно промывали их ПС и добавляли по 100,0 мкл раствора, содержащего 10,0 мл 0,1М лимонной кислоты, 200,0 мкл О-фенилдиамина (ICN) в этаноле (40,0 мкл/мл) и 4,0 мкл 33,0 % H_2O_2 . Пробы инкубировали 20 мин при 20°C и добавляли в них по 100,0 мкл 2N H_2SO_4 для остановки развития окрашивания. Результаты оценивали спектрофотометрически при длине волны 492 нм. Статистическую обработку полученных данных проводили с помощью t-критерия Стьюдента.

Результаты и обсуждение

Исследование выявило способность ПБП модулировать экспрессию ГР в культурах мышинных фибробластов. Фибробласты в культуре достигали монослоя, стабильно вырабатывающего ГР на 4-е сутки их культивирования. ПБП вносили в пробы в широком диапазоне доз: $1 \times 10^{-3} - 1 \times 10^{-12}$ г/мл в различные сроки. Результаты оценивали во всех пробах на 5-е сутки культивирования. На рис.1 представлены результаты исследования выработки ГР под влиянием ПБП, внесенного в культуры фибробластов однократно на 4-е сутки культивирования. Наилучшим образом активность ПБП проявилась в диапазоне доз $1 \times 10^{-8} - 1 \times 10^{-12}$ г/мл. В указанных дозах ПБП после его однократного применения оказался способным повышать суммарную выработку ГР в культурах зрелого монослоя фибробластов в 1,7 – 2,6 раза ($p < 0,001$).

Представлялось интересным выявить также способность ПБП стимулировать выработку ГР в культурах фибробластов различной зрелости. ПБП применяли в дозе 1×10^{-11} г/мл либо однократно; на 1, 2, 3, 4-е сутки, либо четырехкратно: на 1, 2, 3, 4-е сутки культивирования фибробластов. Результаты, представленные на рис.2, оценивали спустя 1 сутки после применения ПБП в каждой отдельной пробе. Так, ПБП во всех случаях повышал суточную выработку ГР в 1,5 – 2,74 раза ($p < 0,001$).

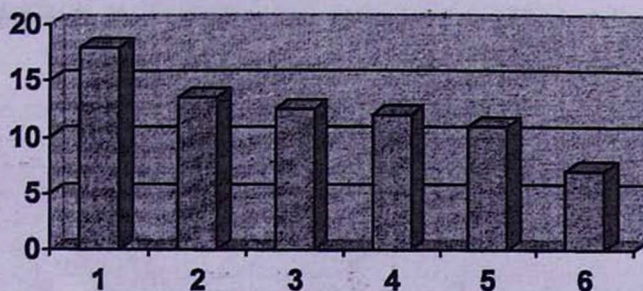


Рис. 1. Изменение суммарной выработки ГР в культурах мышинных фибробластов под действием ПБП.

По оси ординат – концентрация ГР (мкг/мл). По оси абсцисс – дозы ПБП (г/мл): 1 – 1×10^{-12} ; 2 – 1×10^{-11} ; 3 – 1×10^{-10} ; 4 – 1×10^{-9} ; 5 – 1×10^{-8} ; 6 – контроль без ПБП.

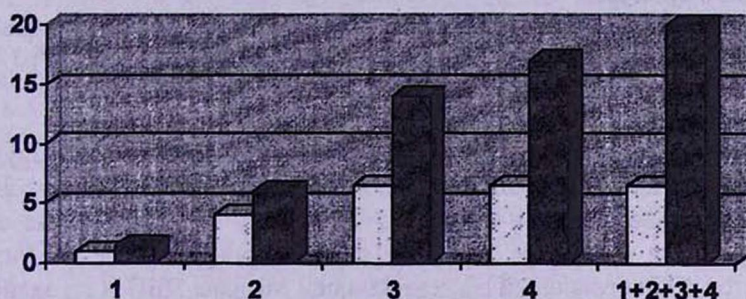


Рис. 2. Изменение суточной выработки ГР в культурах мышинных фибробластов под действием ПБП.

По оси ординат – концентрация ГР (мкг/мл). По оси абсцисс – дни применения ПБП (1×10^{-11} г/мл). Светлые столбики – контроль без ПБП; темные – опыт.

Интересно отметить, что эффект от четырехкратного применения ПБП лишь незначительно отличался по величине от однократного применения: на 4-е сутки – в стадии завершения роста монослоя фибробластов (рис.1). Полученный факт послужил причиной выяснения зависимости экспрессии ГР под действием ПБП от концентрации фибробластов в культуре. Были использованы культуры с различным количеством фибробластов: 1×10^3 – 1×10^4 – 4×10^4 в мл и различными дозами ПБП: 1×10^{-5} – 1×10^{-8} – 1×10^{-11} г/мл. ПБП применяли однократно на 4-е сутки, а результаты оценивали на 5-е сутки культивирования. Данные, представленные на рис. 3, свидетельствуют, что ПБП проявлял стимулирующее выработку ГР действие независимо от количества фибробластов в культуре. Данный эффект зависел только от дозы ПБП. Так, доза ПБП 1×10^{-5} г/мл повышала выработку ГР при концентрации фибробластов 1×10^3 , 1×10^4 , 4×10^4 в мл соответственно в 1,35; 1,32; 1,3 раза ($p < 0,001$). Доза ПБП 1×10^{-8} г/мл повышала продукцию ГР при указанных концентрациях фиб-

робластов соответственно в 1,65; 1,66; 1,68 раза ($p < 0,001$). Доза ПБП 1×10^{-11} г/мл повышала выработку ГР при тех же концентрациях фибробластов в 2,56; 2,57; 2,6 раза ($p < 0,001$) соответственно.

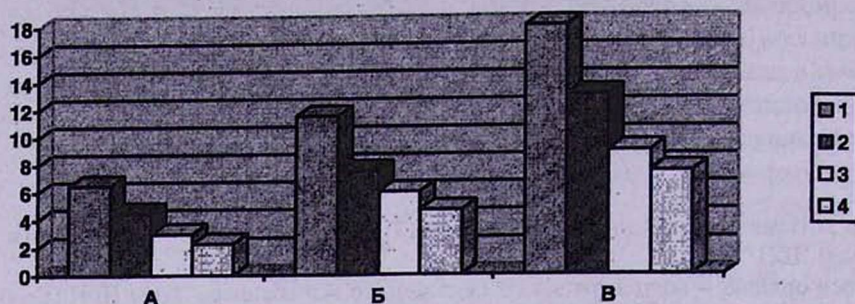


Рис. 3. Зависимость выработки ГР под действием различных доз ПБП от концентрации фибробластов в культуре.

По оси ординат – концентрация ГР (мкг/мл). По оси абсцисс – количество фибробластов в мл: А – 1×10^3 ; Б – 1×10^4 ; В – 4×10^4 ; дозы ПБП (г/мл): 1 – 1×10^{-11} ; 2 – 1×10^{-8} ; 3 – 1×10^{-5} ; 4 – контроль без ПБП.

Таким образом, в результате проведенного исследования обнаружена способность ПБП повышать выработку ГР человека в культурах мышечных фибробластов. ПБП повышал суммарную и суточную выработку гормона как на стадии развития/формирования монослоя, так и на стадии продукции ГР зрелым монослоем фибробластов. Обнаруженный эффект зависел от дозы ПБП и не зависел от сроков его применения и концентрации фибробластов в культуре. Полученные результаты свидетельствуют, что ПБП может участвовать в экспрессии и выделении ГР клетками аденогипофиза, играть роль либерина ГР, а также служить полезным дополнением для увеличения продукции ГР человека в биотехнологии.

Поступила 30.06.00

ՀԻՊՈՓԻՍՏՈՒՍԱԶԻՆ ՊՈԼԻՊԵՊՏԻԳԸ ԽԹԱՆՈՒՄ Ե ՄԱՐԴՈՒ ԱՃԻ ՀՈՐՄՈՆԻ ԷՔՍՊՐԵՍԻԱՆՆ ԵՎ ԵՐԱՊԱՐԱՐՈՒՄ ԵՆԻՆԵՐԻ ՖԻԲՐՈԲԼԱՍՏՆԵՐԻ ԿՈՆԼՏՈՒՐԱՆԵՐՈՒՄ

Վ.Ս.Ապրիլյան, Ս.Գ.Չալիլյան, Ա.Ա.Գալոյան

Ուսումնասիրվել է հիպոթալամուսային պրոլինով հարուստ պոլիպեպտիդի (ՆՊ) հապրկությունը փոփոխել մարդու աճի հորմոնի (ԱՀ) արտադրումը BALB/c մկների ֆիբրոբլաստների կուլտուրաներում երկսայրանոց ELISA իմունաֆերմենտային մեթոդի օգնությամբ:

Հայտնաբերվել է, որ ՆՊ-ը (1×10^{-5} և 1×10^{-12} գ/մլ) խթանում է մարդու ԱՀ-ի արտադրումը մկների ֆիբրոբլաստների (1×10^3 և 4×10^4 մլ) կուլտուրաներում: ՆՊ-ը խթանում է ինչպես ընդհանուր գումարային, այնպես էլ ԱՀ-ի օրական արտադրումը: ՆՊ-ի ազդեցությունը կախված է միայն իր դոզայից, այլ ոչ թե ՆՊ-ի կիրառման ժամկետներից կամ ֆիբրոբլաստների խտությունից կուլտուրաներում:

HYPOTHALAMIC POLYPEPTIDE ENHANCES EXPRESSION OF THE HUMAN GROWTH HORMON IN CULTURES OF BALB/C MICE FIBROBLASTS

V.S.Aprikyan, S.G.Chailyan, A.A.Galoyan

The aim of the study was to investigate the ability of a novel proline-rich hypothalamic polypeptide (HP) to modulate the human growth hormone (hGH) production in BALB/c mice fibroblasts cultures with ELISA test.

It was established that HP (1×10^{-5} – 1×10^{-12} g/ml) has the ability to enhance the hGH production in mice fibroblasts cultures (1×10^3 – 1×10^4 /ml). HP enhances both summer and daily hGH productions. This effect depends on HP dose, but not on the application time, or fibroblasts quantity in cultures.

ЛИТЕРАТУРА

1. Априкян В.С., Галоян К.А. Нейрохимия, 1992, 11, с.27.
2. Априкян В.С., Галоян К.А., Галоян А.А. Нейрохимия, 1992, 11, с.34.
3. Априкян В.С., Галоян К.А. Нейрохимия, 1995, 12, с.14.
4. Априкян В.С., Галоян К.А., Галоян А.А. Нейрохимия, 1998, 15, с.189.
5. Априкян В.С., Галоян А.А. Медицинская наука Армении, 1999, 39, 4, с.29.
6. Галоян А.А., Гурвиц Б.Я. Нейрохимия, 1992, 11, 1, с. 89.
7. Галоян А.А., Априкян В.С., Маркосян К.А., Гурвиц Б.Я. Нейрохимия, 1998, 15, с. 361.
8. Гурвиц Б.Я., Третьяков О.Ю., Галоян А.А. Нейрохимия, 1998, 15, 2, с. 209.
9. Маркосян К.А., Гурвиц Б.Я., Галоян А.А. Нейрохимия, 1999, 16, 1, с.22.
10. Резников М.В., Фидлер Р., Рубцов П.М. и др. Мол.биол., 1989, 23, с. 1692.
11. Свешников П.Г., Громова Н.В., Рубцов П.М. и др. Гормон роста человека, Пушкино, НЦБИ АН СССР, 1988, с. 60.
12. Aprikyan V.S., Galoyan K.A., Galoyan A.A. Neurochem. (NAS RA&RAS), 1998, 15, p. 80.
13. Correale J., Arias M., Gilmore W. J.Immunol., 1998, 161, p.3365.
14. Galoyan A.A., Gurvits B.Ya., Shuvalova L.A. et al. Neurochem.Res., 1992, 17, p.773.
15. Galoyan A.A. Biochemistry of novel cardioactive hormones and immunomodulators of the functional system neurosecretory hypothalamus-endocrine heart. Moscow, 1997.
16. Aprikyan V.S., Galoyan K.A., Galoyan A.A. J. Neurochem., 1999, 72(Suppl.), p. S87D.
17. Morrison S.J., White P.M., Zock C., Anderson D.J. Cell, 1999, 96, p. 737.
18. Snow E.C. J.Immunol., 1985, 135, Supp 1, 2, p.776.
19. Strom J.B., Bangs J.D. J.Immunol., 1982, 128, p. 155.