

УДК 615.324:637.64].076.9:616.13-003.93-076(045)

ВЛИЯНИЕ ВОДНЫХ ПАНТОВЫХ ЭКСТРАКТОВ НА ПРОЦЕССЫ АНГИОГЕНЕЗА

Г.Е. Брилли¹, В.В. Петров²

¹*Саратовский государственный медицинский университет, Саратов (410012, Россия, г. Саратов, ГСП, ул. Большая Казачья, 112) meduniv@sgmu.ru*

²*ООО «Корпорация “СпектрАкустика”», Саратов (410000, Россия, г. Саратов, Большая Казачья, 113) info@spectracoustics.ru*

Подробная информация об авторах размещена на сайте
«Учёные России» - <http://www.famous-scientists.ru>

В опытах на кольцевых препаратах аорты мышей выявлено стимулирующее влияние водных экстрактов, полученных из замороженных или консервированных высокой температурой пантов оленей, на ангиогенез и усиление ангиогенного эффекта при совместном действии экстракта и bFGF. Новообразованием сосудов способствует высокая активность матриксных металлопротеиназ (ММП-2 и ММП-9), содержащихся в водных экстрактах из замороженных пантов.

Характерной особенностью неокостеневших рогов (пантов) оленей является их способность к быстрому росту. Последнее позволяет предположить наличие в пантах специфических ростовых факторов, обеспечивающих не только интенсивную пролиферацию клеток костной, хрящевой и соединительной ткани, но также оказывающих стимулирующее влияние на процессы ангиогенеза, что является необходимым условием адекватного притока кислорода и пластических материалов к растущей ткани. Применяемый в течение длительного времени в медицинской практике пантовый препарат пантокрин является водно-спиртовым экстрактом, приготовляемым из пантов. Однако при спиртовой обработке экстрагируемые белково-пептидные компоненты могут подвергаться частичной денатурации или конформационным перестройкам, что приведет к изменению их свойств и даже к потере биологической активности. В ООО «Корпорация «СпектрАкустика» разработан препарат пантолен, разрешенный к использованию в качестве биологически активной пищевой добавки (свидетельство о государственной регистрации №77.99.23.3.У.12909.11.06 от 29.11.2006 г. ТУ 9358-001-7596883-2006), содержащий в качестве действующего начала водный пантовый экстракт. Тонкие механизмы биологического действия этого

нативного комплекса биологически активных продуктов пока исследованы недостаточно. В связи с этим в настоящей работе поставлена цель изучить влияние водных экстрактов пантов на процессы ангиогенеза.

Методика исследований

Панты оленей, полученные на Алтае, перед транспортировкой в среднюю полосу России подвергались либо заморозке при -18°C либо консервации путем кратковременного погружения в кипящую воду с последующей сушкой в горячем воздушном потоке при температуре 80°C . Водные экстракты получались с использованием оригинальной технологии, обеспечивающей максимальное извлечение и сохранение активных компонентов, содержащихся в исходном сырье. Экстракт, полученный из замороженных пантов, обозначался как ЭЗ, а полученный из пантов, подвергавшихся термической обработке, – как ЭТ. Для изучения процесса ангиогенеза использовались кольцевые препараты аорты мыши [5]. У 8 беспородных белых мышей вырезалась грудная аорта и помещалась в теплую среду Bio-MPM. Фиброно-жировая ткань вокруг сосуда аккуратно удалялась. Под бинокулярной лупой аорта нарезалась на кольца шириной 0,6 мм. Кольца трижды отмывались в теплой стерильной среде Bio-MPM и помещались в коллагеновый гель, полученный из сухо-

жилий крысиных хвостов по методу [4]. В гель добавлялась среда Bio-MPM (500 мкл) с 1% глутамина, 100 Ед/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина. Пантовые экстракты, предварительно пропущенные через бактериальный фильтр (0,22 мкм), добавлялись в среду в количестве 1% по объему. В отдельных пробах в качестве стимулятора ангиогенеза использовали ростовой фактор фибробластов (fibroblast growth factor b, bFGF) в концентрации 50 нг/мл. Препараты выдерживались в течение 1 недели при 37°C, 8% CO₂ во влажной атмосфере. Смена среды, добавление экстрактов и bFGF производились каждые 2 дня. После указанного периода препараты фиксировались 4% формалином 24 часа и окрашивались 0,02% раствором кристалвиолета в этаноле. Окрашенные препараты фотографировались цифровой камерой, соединенной с микроскопом (увеличение x20). Измерение площади, покрытой новообразованными сосудами (в мм²), проводилось с использованием имидж-анализатора. Содержание латентной и активной форм матриксных металлопротеиназ (ММП-2 и ММП-9) в пантовых экстрактах исследовали методом прямой желатиновой зимографии с предварительным вертикальным электрофорезом [3]. Статистическая обработка полученных цифровых данных проводилась с использованием *t*-критерия Стьюдента. Межгрупповые различия средних значений показателей считались достоверными при $p < 0,05$.

Результаты исследований

Опыты показали, что в контрольных кольцевых препаратах аорты, не подвергавшихся воздействию пантового экстрак-

та и находящихся в питательной среде в течение недели, отмечался очень слабый рост сосудов, по-видимому, за счет фонового образования ростовых факторов клеточными элементами ткани аорты. Площадь новообразованных сосудов составляла в среднем $0,32 \pm 0,08$ мм² (таблица 1). После регулярного добавления в культуральную среду ЭЗ отмечалась заметная интенсификация процесса ангиогенеза и трехкратное увеличение площади новообразованных сосудов ($p < 0,001$) (рис.1). Менее отчетливым стимулирующим эффектом обладал ЭТ. Однако и в этом случае имелось отчетливое (двукратное) увеличение площади новообразованных сосудов по сравнению с контролем ($p < 0,02$). Статистически достоверных различий между выраженностью ангиогенного эффекта ЭЗ и ЭТ выявлено не было ($p > 0,2$), что свидетельствует о наличии сходного стимулирующего влияния на ангиогенез у обоих пантовых экстрактов.

Добавление в питательную среду только ростового фактора (bFGF) без пантового экстракта не вызывало заметной стимуляции ангиогенеза, поскольку bFGF подключается к участию в образовании структур сосудистой стенки на поздних этапах ангиогенеза, когда уже сформирован контур сосуда за счет пролиферации эндотелиальных клеток, первично стимулированной другими ростовыми факторами (в частности, VEGF) [2]. В этой ситуации bFGF повышает митотическую активность и стимулирует функцию фибробластов и тучных клеток, обеспечивающих синтез компонентов экстраклеточного матрикса [1].

Таблица 1. Влияние пантовых экстрактов и bFGF на ангиогенез в опытах на кольцевых препаратах аорты мыши ($M \pm m$)

Серия опытов	Площадь новообразованных сосудов (мм ²)	p	p ₁	p ₂	p ₃
Контроль	$0,32 \pm 0,08$	-	-	-	-
ЭЗ	$0,96 \pm 0,18$	$<0,001$		$>0,2$	
ЭТ	$0,67 \pm 0,12$	$<0,02$			
bFGF	$0,28 \pm 0,09$	$>0,5$			
bFGF+ЭЗ	$2,16 \pm 0,18$	$<0,001$	$<0,001$		
bFGF+ЭТ	$1,03 \pm 0,24$	$<0,001$	$<0,01$		$<0,001$

Примечание: p – достоверность различий с контролем;

p₁ – достоверность различий с bFGF;

p₂ – достоверность различий между ЭЗ и ЭТ;

p₃ – достоверность различий между bFGF+ЭЗ и bFGF+ЭТ.

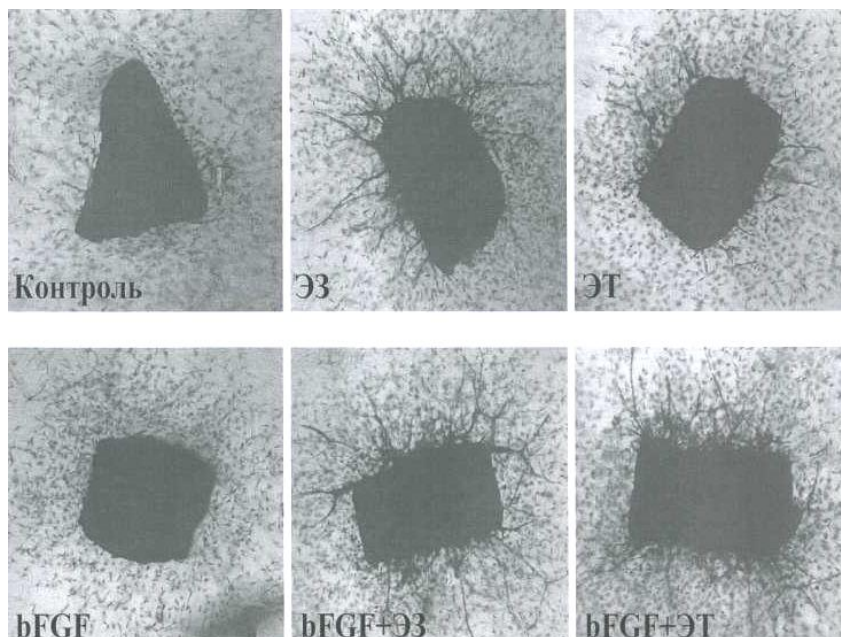


Рис. 1. Стимуляция ангиогенеза в кольцевых препаратах аорты мыши под влиянием пантовых экстрактов

ЭЗ – экстракт, полученный из замороженных пантов;

ЭТ – экстракт, полученный из пантов, подвергнутых тепловой обработке;

bFGF – ростовой фактор фибробластов b.

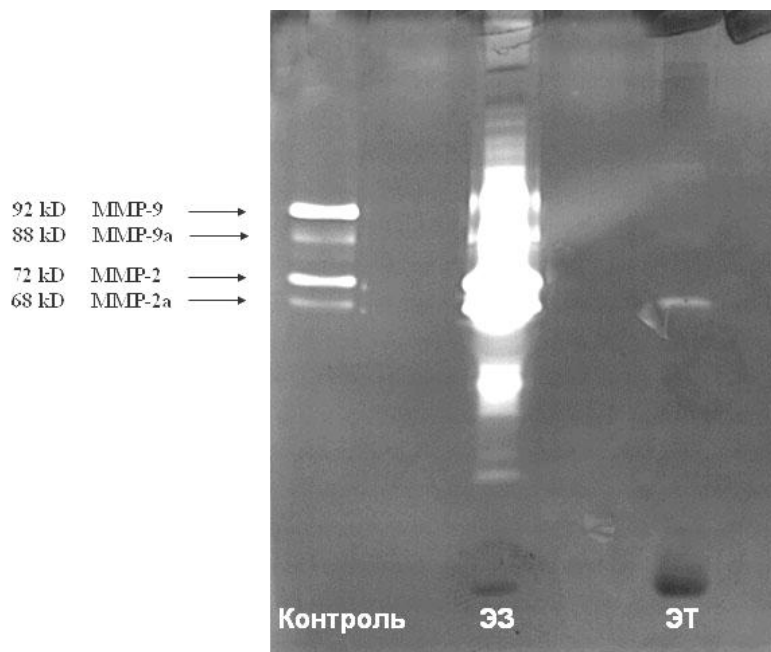


Рис. 2. Желатиназная активность матриксных металлопротеиназ пантовых экстрактов

Добавление в культуральную среду bFGF вместе с пантовым экстрактом (ЭЗ) вызвало весьма значительное увеличение площади новообразованных сосудов, как по сравнению с контролем, так и по сравнению с влиянием только bFGF ($p < 0,001$). При этом площадь сосудов, по сравнению

с контролем, возрастала в 6,5 раз. Ангиогенный эффект при комбинированном использовании bFGF и экстракта ЭТ также был весьма отчетливым: площадь сосудистого русла возрастала в 3 раза по сравнению с контролем ($p < 0,001$). Следовательно, наиболее выраженный ангиогенный

эффект наблюдается при совместном действии ЭЗ и bFGF. В данном сочетании ангиогенный эффект ЭТ выражен значительно слабее ($p < 0,001$).

Важными факторами, участвующими в неоангиогенезе, являются протеолитические ферменты, разрушающие компоненты матрикса, облегчающие миграцию клеток и формирование необходимой архитектоники сосудистой сети [6]. В связи с этим далее мы изучили содержание металлопротеиназ в водных пантовых экстрактах (рис.2). Как можно видеть, зимографическая картина в зоне позитивного контроля позволяет четко дифференцировать два типа металлопротеиназ, их латентные (ММП-2 и ММП-9) и активные (ММП-2а и ММП-9а) формы. В пантовом экстракте, полученном из замороженных пантов (ЭЗ), отмечается ярко выраженная активность обоих типов металлопротеиназ. Ферментативная деструкция субстрата выявляется даже в зонах, содержащих неидентифицируемые в данном исследовании белки с большей и меньшей, чем ММП, молекулярной массой. ЭТ обладает очень слабой металлопротеиназной активностью, связанной с наличием только ММП-2 формы, чем, по-видимому, объясняется его менее выраженный ангиогенный эффект.

Следовательно, водные экстракты, полученные из пантов оленей, содержат в своем составе компоненты, обладающие отчетливым ангиостимулирующим эффектом, а также металлопротеиназы, облегчающие ангиогенез. Ангиогенный эффект заметно усиливается при комбинированном использовании экстрактов с bFGF. Обнаружение способности пантовых экстрактов стимулировать процессы новообразования сосудов является основанием для их апробации в качестве стимуляторов репаративной регенерации при различных формах повреждения тканей (травма, рана, язва, ишемия, некроз).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ:

1. Пальцев М.А., Иванов А.А. Межклеточные взаимодействия. – М.: Медицина, 1995.
2. Ferrara N. // *Seminars in Oncology*. – 2002. – Vol.29, N 6. – P.10-14.
3. Liota, L.A., Stetler-Stevenson W.G. // *Cancer Biology*. – 1990. – №1. – P.96-106.
4. Montesano R., Orci L., Vassalli P. // *J. Cell Biol.* – 1993. – Vol.97. – P.1648-1652.
5. Nicosia R.F., Ottinetti A. // *Lab. Invest.* – 1990. – Vol.63. – P.115-122.
6. Senger D. R. // *Amer. J. Path.* – 1996. – Vol. 149. – P.1-7.

INFLUENCE OF WATER EXTRACTS FROM VELVET ANTLERS ON ANGIOGENESIS

G.E. Brill, V.V. Petrov

Saratov State Medical University, Russia

«Corporation "SpectrAcoustics"», Saratov, Russia

In experiments on mice aortic ring preparations stimulatory effect of water extracts obtained from velvet antlers conserved either by freezing or heat-treating on angiogenesis has been shown. Combined use of the extracts and bFGF exhibits an enhanced angiogenic effect. Increased matrix metalloproteinase activity (MMP-2 and MMP-9) determined in frozen extract promotes angiogenesis.