

УДК 617.7-007.681-085

Экспериментальные исследования эффективности Ретиналамина

АНТОНОВ А.А., к.м.н., ведущий научный сотрудник;
МАКАРОВА А.С., к.м.н., научный сотрудник;
РЕЩИКОВА В.С., к.м.н., младший научный сотрудник.

ФГБНУ «НИИГБ», отдел глаукомы, 119021, Москва, ул. Россолимо, д. 11А,Б.

*Авторы не получали финансирование при проведении исследования и написании статьи.
Конфликт интересов: отсутствует.*

Резюме

В статье проанализированы литературные данные, посвященные экспериментальным работам, связанным с применением Ретиналамина — комплекса полипептидов, выделенных из сетчатки глаза животных. При выполнении ряда работ на клеточных культурах была установлена тканеспецифичность действия пептидных биорегуляторов. В результате исследований на лабораторных животных, проводимых с 1988 г., выявлены основные эффекты Ретиналамина: нейральная индукционная активность, пролиферативное действие в отношении клеток сетчатки и пигментного эпителия, а также защитные эффекты в отношении ганглиозных клеток и их аксонов. Дополнительными эффектами воздействия были влияние в различных концентрациях *in vitro* на показатели иммунитета, агрегационные свойства тромбоцитов и фибринолиз. Ретиналамин способствовал стимуляции фибринолитической активности крови, что, возможно, обусловлено наличием в его составе низкомолекулярного активатора плазминогена. Изученная зависимость пролиферативного действия в зависимости от срока воздействия и концентрации вещества указывает на достаточную эффективность в диапазоне, создаваемом при парентеральном введении. Действие пептидных биорегуляторов оказалось различным при культивировании ткани молодых и старых крыс.

Зона роста была больше при культивировании сетчатки молодых животных, чем старых. Важным моментом является влияние на процессы в соединительной ткани, что может иметь перспективы для влияния на склеру и роговицу при глаукоме. Под действием препарата произошло снижение времени восстановления целостности поврежденных эпителиального, стромального и эндотелиального пластов роговицы за счет мембраностабилизирующего действия на поврежденные клеточные структуры. В эксперименте безопасность препарата установлена даже для эпиретинального (интравитреального) введения. Результаты исследований на животных являются основой для планирования клинических работ и указывают на направления возможного использования Ретиналамина в терапии офтальмологической патологии. Доступные публикации указывают на его возможную эффективность при таких патологиях как глаукома, возрастная макулярная дегенерация, травматические повреждения органа зрения. Остается актуальным вопрос о повышении эффективности лечения Ретиналамином путем его адресной доставки к тканям-мишеням.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: Ретиналамин, пептидные препараты, ганглиозные клетки сетчатки, волокна зрительного нерва, глаукома, пигментный эпителий.

Для контактов:

Антонов Алексей Анатольевич, e-mail: niigb.antonov@gmail.com

ENGLISH

Experimental studies of Retinalamin efficacy

ANTONOV A.A., Ph.D., Leading Research Associate;
MAKAROVA A.S., Ph.D., Research Associate;
RESHCHIKOVA V.S., Ph.D., Junior Research Associate.

Glaucoma Department of the Scientific Research Institute of Eye Diseases,
 11A, B Rossolimo st., Moscow, Russian Federation, 119021.

Conflicts of Interest and Source of Funding: none declared.

Abstract

The article analyses literature data on experimental research on Retinalamin — a peptide complex extracted from animal retinal tissue. A series of cell culture based experiments established peptide bioregulators tissue specificity. Animal experiments conducted since 1988, identified the main effects of Retinalamin: neural induction activity, proliferative activity towards retinal cells and pigment epithelium, and protective action towards ganglion cells and their axons. Various concentrations in vitro had an effect on immunity parameters, platelet aggregation properties and fibrinolysis. A low-molecular plasminogen activator contained in Retinalamin may account for fibrinolytic activity stimulation. The investigated correlation between proliferative action and Retinalamin concentration and course duration indicates a sufficient efficacy of parenteral administration. Peptide bioregulators activity differed in cultivated retinal tissues of young and old rats with growth zone area

being bigger in the young ones. The effect of Retinalamin on connective tissue processes may show promise for affecting sclera and cornea in glaucoma patients. Retinalamin membrane stabilizing effect on damaged cellular structures led to a reduction in integrity recovery time for the compromised epithelial, stromal and endothelial corneal layers. Our experiment established the safety of Retinalamin use, including cases of intravitreal administration. Animal experiments present a base for future clinical research planning and studies of possible ways of Retinalamin use in clinical practice. Available publications reveals its potential bioaccessibility in such pathologies as glaucoma, age-related macular degeneration and ocular trauma. The problem of increasing Retinalamin efficacy by delivering it directly to the target tissues still remains relevant.

KEYWORDS: Retinalamin, peptide drugs, retinal ganglion cells, optic nerve fibres, pigment epithelium.

Ретиналамин — комплекс полипептидов, выделенных из сетчатки глаза животных. Препарат регулирует процессы метаболизма в сетчатке, стимулирует функции клеточных элементов сетчатой оболочки, способствует улучшению функционального взаимодействия пигментного эпителия и наружных сегментов фоторецепторов при различной патологии сетчатки, усиливает активность ретинальных макрофагов, оказывает нормализующее влияние на коагуляцию крови и обладает выраженным протекторным эффектом в отношении сосудистого эндотелия [1]. Ретиналамин, обладая ярко выраженным протекторным действием в отношении сосудистого эндотелия и коллагеновых волокон периваскулярной соединительной ткани, способствует восстановлению нарушенных структур сосудистой стенки.

Активное изучение Ретиналамина началось с 1985 г., когда впервые он был выделен. А.И. Днепровская и С.В. Харинцева (1988) провели ряд исследований по влиянию Ретиналамина на течение

экспериментальных ретинопатии. Авторы исследовали его влияние в различных концентрациях in vitro на показатели иммунитета, агрегационные свойства тромбоцитов и фибринолиз. Ретиналамин способствовал стимуляции фибринолитической активности крови, что, возможно, обусловлено наличием в его составе низкомолекулярного активатора плазминогена. Как показали опыты на фибриновых пластинках, Ретиналамин содержит низкомолекулярный ингибитор плазмينا и трипси-на. Полученные данные свидетельствовали о нормализующем влиянии препарата на состояние системы гемокоагуляции. Кроме того, было показано иммуномодулирующее действие Ретиналамина. Под его воздействием значительно увеличивалась экспрессия рецепторов на Т- и В-лимфоцитах, повышалась фагоцитарная активность нейтрофилов.

Исходя из концепции биорегулирующей терапии, предполагающей, что полипептиды из различных органов повышают резистентность данных органов к действию патологических агентов, был

проведен ряд экспериментов. На основе созданных экспериментальных моделей дистрофии сетчатки исследовали действие Ретиналамина на течение патологического процесса. Препарат оказал выраженное терапевтическое действие при токсической дистрофии сетчатки, вызванной введением 3% раствора йодистого калия. При офтальмоскопии у подопытных кроликов, получавших Ретиналамин, наблюдалось уменьшение размеров дистрофических очагов, отека сетчатки. Клинические данные нашли подтверждение при гистологическом исследовании.

Была проведена большая экспериментальная работа по изучению влияния Ретиналамина на процессы регенерации нейрорецепторного аппарата глаза [2]. Эксперименты были проведены на крысах линии Campbell, страдающих генетически детерминированной пигментной дегенерацией сетчатки. Полученные данные свидетельствовали о способности Ретиналамина тормозить развитие дистрофического процесса сетчатки.

И.Б. Максимов (1996) изучил эффективность применения пептидных биорегуляторов (включая Ретиналамин) в сочетании с микрохирургическим лечением при травмах роговицы, сетчатки и их последствий. Автором были созданы экспериментальные модели для изучения репаративных процессов в роговице и сетчатке. Под действием препаратов произошло снижение времени (в 1,5-2 раза) восстановления целостности поврежденных эпителиального, стромального и эндотелиального пластов роговицы за счет мембраностабилизирующего действия на поврежденные клеточные структуры (по данным кератоимпедансометрии). При сквозных ранениях роговицы, помимо ускорения репаративной регенерации, пептидные биорегуляторы увеличивали в 1,8 раза прочность формирующегося роговичного рубца, усиливали функцию местного иммунитета (по данным лизосомально-катионного теста в 2,2-2,5 раза) и способствовали формированию незначительного по интенсивности помутнения роговицы.

Применение Ретиналамина при экспериментальном лазерном повреждении сетчатки, а также при токсической дистрофии, вызванной действием монооксидной кислоты, позволило у 78,4% экспериментальных животных получить лечебный эффект, проявляющийся в ускорении в 2-2,5 раза (по сравнению с контролем) покрытия дефекта сетчатки клетками пигментного эпителия, предотвращении дальнейшего развития патологического процесса, а также снижении (по данным электроретинограммы) степени угнетения функционального состояния сетчатки. Ретиналамин оказал нормализующее влияние на течение экспериментальных тромбозов вен сетчатки, вызванных введением тромбина [3]. При гистологическом исследовании глаз кроликов в контрольной группе были выявлены

грубые патологические изменения: обширные плазмо- и геморрагии, во внутреннем зернистом слое отмечалась фрагментация ассоциативных нейронов, обширные очаги некроза, захватывающие все слои сетчатки, отслойка сетчатки на большом протяжении. При использовании Ретиналамина гистологическая картина носила более благоприятный характер: отек сетчатки наблюдался только в наружных слоях, геморрагии практически отсутствовали, массивные очаги некроза не регистрировались, лишь единичные нейроны подвергались разрушению.

При выполнении ряда работ на клеточных культурах была установлена тканеспецифичность действия пептидных биорегуляторов [4-7]. Возможно, что набор пептидов, полученный из определенной ткани или органа, имеет в своем составе те пептиды, которые опосредуют такое явление, как аутоиндукция, то есть поддержание тканевой специфичности в процессе функционирования тканей взрослого организма. Это предположение было проверено С.В. Трофимовой при изучении индукционного влияния Ретиналамина на полипотентной эмбриональной ткани [8].

При исследовании индукции Ретиналамина на клетки полипотентной ткани эктодермы ранней гастролы *Xenopus laevis* автором выявлено, что Ретиналамин обладает нейтральной индукционной активностью. После воздействия препарата на эктодерму ранней гастролы запускается нейтральная дифференцировка, включая мозг, сетчатку, пигментный эпителий. В зависимости от концентрации Ретиналамина развивались различные ткани. Необходимо отметить, что при воздействии Ретиналамина в концентрации 50 нг/мл в ряде случаев развивался не только мозг, но, возможно, в составе его возникал также эпифиз. При воздействии Ретиналамина в концентрации 10 нг/мл в двух культурах из восьмидесяти, взятых в исследование, развилась сетчатка и в одной пигментный эпителий. Установлено, что для Ретиналамина имеет место непрямая зависимость индукционного эффекта от концентрации индуцирующего фактора, поскольку он оказывал влияние даже в концентрации 2 нг/мл, что нехарактерно для других белков и пептидов.

Также автором была изучена пролиферативная активность Ретиналамина на клеточные культуры сетчатки и пигментного эпителия крыс Wistar. Анализ результатов воздействия показал статистически достоверную зависимость митогенной активности клеток от концентрации Ретиналамина. Установлено, что клетки пигментного эпителия пролиферируют несколько активнее, чем клетки сетчатки. Результаты, полученные после первой недели культивирования, показали, что наибольшая митогенная активность наблюдается при воздействии на клетки сетчатки и пигментного эпителия Ретиналамина в концентрации 200 нг/мл. Митогенная

активность клеток пигментного эпителия и сетчатки при воздействии Ретиналамина в течение последующих трех недель оказалась максимальной при концентрациях 50 и 100 нг/мл.

Полученные данные указывают на значительную способность Ретиналамина в определенной концентрации тканеспецифически вызывать активную пролиферацию клеток культуры сетчатки и пигментного эпителия. Необходимо указать на многофункциональную способность пептидных препаратов контролировать пролиферативную активность клеток соответствующей ткани и запускать процесс дифференцировки в полипотентной ткани.

При воздействии на дифференцированные клетки взрослого организма в кратковременной культуре наблюдается пролиферативная активность клеток, однако при этом поддерживается и их тканевая специфичность. Необходимо подчеркнуть, что процесс пролиферации не подавляет процесс поддержания тканеспецифической дифференцировки, т.е. два механизма работают синхронно, и клетки в процессе культивирования не теряют признаков дифференцированной ткани. Пептидные регуляторы способны воздействовать как на дифференцированные клетки взрослого организма, запуская пролиферацию клеток и поддерживая при этом тканевую специфичность, так и на полипотентные эмбриональные клетки, индуцируя тканеспецифическую дифференцировку [9].

Задачей исследования была оценка влияния Ретиналамина на органотипическую культуру ткани молодых и старых животных. Для культивирования использовали ткани сетчатки глаза эмбрионов цыплят и новорожденных крыс, то есть молодых организмов, обладающих высоким потенциалом роста и дифференцировки. Кроме того, представляет большой интерес исследование влияния пептидных препаратов на ткани старых организмов, у которых менее выражены ростовые и адаптационные способности. В 1 сут. культивирования во всех образцах наблюдали распластывание эксплантатов ткани на коллагеновой подложке и начало выселения пролиферирующих клеток по периферии эксплантата. Через 3 сут., если в эксперименте происходила стимуляция развития зоны роста, индекс площади экспериментальных эксплантатов увеличивался по сравнению с индексом площади контрольных эксплантатов. Для выявления эффективных концентраций в культуру тканей эмбриона цыпленка добавляли пептиды в диапазоне концентраций от 0,5 до 100,0 нг/мл. Эффективной концентрацией для Ретиналамина оказалась 20,0 нг/мл. Ретиналамин достоверно стимулировал рост эксплантатов сетчатки на $2,49 \pm 0,3$ у.е. Дальнейшее увеличение дозы не оказывало дополнительного влияния на рост эксплантатов ткани. Под действием Ретиналамина индекс площади культуры ткани увеличился на 25%.

Найденная для каждого пептида эффективная концентрация была использована в последующих сериях опытов — на молодых и старых крысах Wistar. Ретиналамин достоверно стимулировал рост эксплантатов сетчатки молодых крыс на $2,67 \pm 0,12$ у.е., старых на $1,68 \pm 0,12$ у.е. по сравнению с контролем. Действие пептидных биорегуляторов оказалось различным при культивировании ткани молодых и старых крыс. Зона роста была больше при культивировании сетчатки молодых животных, чем старых.

Экспериментальное исследование морфологических изменений, происходящих в заднем отрезке глазного яблока при глаукоме на фоне введения Ретиналамина, было проведено в 2008 г. на модели адреналининдуцируемой глаукомы у 38 кроликов по схеме Е.М. Липовецкой (1966). Эта модель является экспериментальным аналогом ПОУГ и характеризуется формированием глаукоматозного симптомокомплекса, включающего развитие трабекуло- и нейрорпатии в глазу. Проведён морфометрический анализ ганглиозных клеток сетчатки и нейронов зрительного нерва, на фоне воздействия Ретиналамина установлено наиболее выраженное защитное действие на мелкие ганглиозные клетки, в меньшей степени на средние и в последнюю очередь — на крупные клетки. Сохранность общего количества клеток по сравнению с группой сравнения была повышена на 43%. Воздействие препарата выражалось в понижении степени повреждения зрительного нерва и количества гибнущих ганглиозных клеток сетчатки, снижении атрофических процессов в слое их аксонов, повышении активности мюллеровских клеток. Доказано увеличение активности мюллеровских клеток за счет увеличения экспрессии глутамин-синтетазы и индуцибельной синтазы оксида азота, что отражает влияние глии на коррекцию метаболизма [10].

В Уфимском НИИ глазных болезней в 2012 г. исследована репаративная активность пигментного эпителия сетчатки кроликов на фоне применения пептидных биорегуляторов (Ретиналамин). В различные сроки оценено состояние клеток пигментного эпителия в двух группах. В контрольной группе отмечали уплощенные клетки пигментного эпителия с небольшим количеством меланина в цитоплазме даже через 1 месяц после повреждения. В опытной группе многие клетки имели кубическую форму, цитоплазма клеток содержала гранулы меланина различной интенсивности и на 30-е сутки лечения животных отмечали постепенное восстановление пигментного эпителия сетчатой оболочки глазного яблока. Установлено, что применение пептидных регуляторов в послеоперационном периоде способствует ускорению репаративной регенерации пигментного эпителия за счет миграции уплощенных пигментных клеток в очаг повреждения, внутриклеточного накопления гранул меланина, восстановления формы клеток и уменьшения воспалительной реакции собственно сосудистой оболочки [11].

Современные экспериментальные исследования Ретиналамина связаны с поиском альтернативных путей его введения, которые могут облегчить адресную доставку лекарственного вещества и создать его депо у диска зрительного нерва. Препарат применяется субконъюнктивально, в субтеноново пространство, под кожу висков, эндолимфатическим путем, а также методом эндоназального электрофореза. У каждого из этих методов есть как свои преимущества, так и недостатки, такие как низкая концентрация в зоне патологического очага из-за системной абсорбции препарата, длительность курса лечения, парабульбарные гематомы, риск перфорации глазного яблока и др. В связи с этим на базе Сибирского государственного медицинского университета были проведены экспериментальные исследования по применению Ретиналамина путем эпиретинального введения. Проведена серия экспериментов на 20 крысах породы Wistar, разделенных на 2 группы. При морфологическом исследовании сетчатки крыс через 1, 3, 7, 14 и 21 сутки после эпиретинальной инъекции и в основной группе, и в группе сравнения патологических изменений не было выявлено. Слои сетчатки сохраняли нормальное строение на протяжении всего эксперимента [12].

Таким образом, в экспериментальных работах доказано влияние Ретиналамина на пролиферацию и дифференцировку различных клеток в тканях органа зрения. Полученные результаты указывают на его возможную эффективность при таких патологиях, как глаукома, возрастная макулярная дегенерация, травматические повреждения. Остается актуальным вопрос о повышении эффективности лечения Ретиналамином путем его адресной доставки к тканям-мишеням.

Литература/References

- Хавинсон В.Х., Кузник Б.И., Рыжак Г.А. Пептидные биорегуляторы — новый класс геропротекторов. Сообщение 1. Результаты экспериментальных исследований. *Успехи геронтологии* 2012; 25(4):696-708. [Khavinson V.Kh., Kuznik B.I., Ryzhak G.A. Peptide bioregulators: the new class of geroprotectors. Message 1. Experimental studies results. *Advances in gerontology* 2012; 25(4):696-708. (In Russ.)].
- Хавинсон В.Х., Разумовский М.И., Балашов Н.В. и др. Влияние пептидов сетчатки на регенерацию нейрорецепторного аппарата глаза. *Реактивность и регенерация тканей* 1990:15. [Khavinson V.Kh., Razumovskiy M.I., Balashov N.V. et al. Retinal peptide influence on the neuroreceptive eye mechanism regeneration. *Reaktivnost' i regeneratsiya tkanei* 1990:15. (In Russ.)].
- Харинцева С.В. Влияние ретилина на фибринолитическую и коагуляционную активность слезной жидкости у больных с тромбозами вен сетчатки. Экологические интоксикации: биохимия, фармакология, клиника: тезисы докладов Всеросс. конф. Чита, 1996; 283-285. [Kharintseva S.V. Retilin influence on the tear coagulative activity in the patients with retinal vein thrombosis. Ecological intoxications: biochemistry, pharmacology, clinics: theses of All-Russ. conference. Chita, 1996; 283-285. (In Russ.)].
- Анисимов С.В., Бохелер К.Р., Хавинсон В.Х., Анисимов В.Н. Изучение действия пептидов вилонина и эпителина на экспрессию генов в сердце мыши с помощью технологии на основе микрочипов. *Бюллетень экспериментальной биологии* 2002; 133(2):340-347. [Anisimov S.V., Bokheler K.R., Khavinson V.N. Study of vilon and epithalon peptides on the gene expression in murine heart with microchip technology. *Bulletin of experimental biology* 2002; 133(2):340-347. (In Russ.)].
- Анисимов В.Н., Хавинсон В.Х., Алимова И.Н., Провинциали М., Манчини Р., Франчески К. Эпителин угнетает развитие опухолей и экспрессию онкогена HER-2/NEU в опухолях молочной железы у трансгенных мышей с ускоренным старением. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины* 2002; 133(2):199-202. [Anisimov V.N., Khavinson V.Kh., Alimova I.N., Provintsiiali M., Manchini R., Francheski K. Epithalon inhibits tumor development and HER-2/NEU oncogene expression in the mammae tumors in transgenic mice with accelerated aging. *Bulletin of experimental biology and medicine* 2002; 133(2):199-202. (In Russ.)].
- Бродский В.Я., Хавинсон В.Х., Золотарев Ю.А., Нечаева Н.В., Малинин В.В., Новикова Т.Е. и др. Ритм синтеза белка в культурах гепатоцитов крыс разного возраста. Норма и действие пептида ливагена. *Известия РАН. Серия биологическая* 2001; 5:517-521. [Brodskiy V.Ya., Khavinson V.Kh., Zolotarev Yu.A., Nechaeva N.V., Malinin V.V., Novikova T.E. et al. Protein synthesis rhythm in hepatocytic cultures of mice of different age. *Biology Bulletin* 2001; 5:517-521. (In Russ.)].
- Гончарова Н.Д., Хавинсон В.Х., Лапин Б.А. Регулирующее влияние эпителина на продукцию мелатонина и кортизола у старых обезьян. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины* 2001; 131(4):466-468. [Goncharova N.D., Khavinson V.Kh., Lapin B.A. Regulatory effect of Epithalon on production of melatonin and cortisol in old monkeys. *Bulletin of experimental biology and medicine* 2001; 131(4):466-468. (In Russ.)].
- Трофимова С.В., Хавинсон В.Х. Сетчатка и старение. *Успехи геронтологии* 2002; 9:79-82. [Trofimova S.V., Khavinson V.Kh. Retina and aging. *Advances in gerontology* 2002; 9:79-82. (In Russ.)].
- Хавинсон В.Х., Земчихина В.Н., Трофимова С.В., Малинин В.В. Влияние пептидов на пролиферативную активность клеток и пигментного эпителия. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины* 2003; 135(6):700-702. [Khavinson V.Kh., Zemchikhina V.N., Trofimova S.V., Malinin V.V. Peptide influence on the cell and pigment epithelium proliferative activity. *Bulletin of experimental biology and medicine* 2003; 135(6):700-702. (In Russ.)].
- Алексеев В.Н., Чурилина Н.Ю., Павлова Е.А. Морфометрическое обоснование нейропротекторного действия пептидов при первичной открытоугольной глаукоме. *Успехи современного естествознания* 2008; 2:49-51. [Alekseev V.N., Churilina N.Yu., Pavlova E.A. Morphometric justification of peptide neuroprotective activity in primary open-angle glaucoma. *Advances in current natural sciences* 2008; 2:49-51. (In Russ.)].
- Бикбов М.М., Файзрахманов Р.Р., Ярмаухаметова А.Л., Бикбулатов Р.М. Макулярная дегенерация сетчатки в эксперименте. *Медицинский вестник Башкортостана* 2012; 7(3):53-56. [Bikbov M.M., Faizrahmanov R.R., Yarmukhametova A.L., Bikbulatov R.M. Retinal macular degeneration in experimental study. *Meditinskii vestnik Bashkortostana* 2012; 7(3):53-56. (In Russ.)].
- Исайкина Н.В., Запускалов И.В., Кривошеина О.И. Возможности применения ретиналамина методом эпиретинального введения. *Современные проблемы науки и образования* 2015; 6:320-326. [Isaykina N.V., Zapuskalov I.V., Krivosheina O.I. Possible application of retinalamin in form of epiretinal therapy. *Modern problems of science and education* 2015; 6:320-326. (In Russ.)].

Поступила: 28.04.2017