

БИОГЕРОНТОЛОГИЯ

УДК 577.24

ПЕПТИДЫ ТКАНЕСПЕЦИФИЧЕСКИ СТИМУЛИРУЮТ ЭКСПРЕССИЮ СИГНАЛЬНЫХ МОЛЕКУЛ В КУЛЬТУРАХ КЛЕТОК СЕЛЕЗЕНКИ У ЖИВОТНЫХ РАЗНОГО ВОЗРАСТА

Линькова Н.С.^{1,3}, Червякова Н.А.¹, Костылев А.В.¹, Дудков А.В.¹, Тендлер С.М.²

¹Санкт-Петербургский институт биорегуляции и геронтологии, г. Санкт-Петербург, Россия, e-mail: ibg@gerontology.ru

²Каролинский университетский госпиталь, Сольна, Стокгольм, Швеция, e-mail: info@emc-assistance.ru

³Санкт-Петербургский государственный политехнический университет, г. Санкт-Петербург, Россия, e-mail: info@intranstech.com

В поддержании функциональной активности иммунной системы с нервной и эндокринной системами участвуют сигнальные молекулы. Наиболее многофункциональными сигнальными молекулами являются такие регуляторные пептиды как: нейропептиды VIP (vasoactive intestinal peptide) и CGRP (calcitonin gene related peptide), которые синтезируются в иммунных клетках, и уровень экспрессии которых с возрастом снижается.

Цель исследования - сравнительное изучение действия пептидных биорегуляторов (ПБ) на экспрессию сигнальных молекул в культурах клеток селезенки животных разного возраста.

В результате проделанной работы было выяснено, что в органотипических культурах клеток селезенки молодых и старых животных установлено таргетное действие пептидных биорегуляторов (тимоген, дипептид АВ-0). Пептиды АВ-0 и тимоген активируют экспрессию маркеров макрофагов (CD68) и В-лимфоцитов (CD20) в селезенке при ее старении.

Ключевые слова: иммунная система, пептиды, таргетное действие, культуры клеток, старение.

PEPTIDES TISSUE-SPECIFICALLY STIMULATE THE EXPRESSION OF SIGNALING MOLECULES IN THE SPLEEN CELL CULTURES OF DIFFERENT AGE ANIMALS

Linkova N.S.^{1,3}, Chervyakova N.A.¹, Dudkov A.V.¹, Kostylev A.V.¹, Tendler S.M.²

¹Saint Petersburg Institute of Bioregulation and Gerontology, St. Petersburg, Russia, e-mail: ibg@gerontology.ru

²Karolinska University Hospital, Solna, Stockholm, Sweden, e-mail: info@emc-assistance.ru

³Saint Petersburg Polytechnical University, e-mail: info@intranstech.com

In maintaining the functional activity of the immune system with the nervous and endocrine systems involved signaling molecules. Most signaling molecules are multifunctional regulatory peptides such as: neuropeptides VIP (vasoactive intestinal peptide) and CGRP (calcitonin gene related peptide), which are synthesized in the immune cells, and the expression level of which decreases with age.

The purpose of research - a comparative study of the effects of peptide bioregulators (PB) on the expression of signaling molecules in cultures of spleen cells from animals of different ages.

As a result of this work it was found that in organotypic cultures of young and old animals spleen was shown target action of peptide bioregulators (thymogen, dipeptide AB-0). Peptides AB-0 and timogen activate expression of macrophages (CD68) and B cells (CD20) markers in spleen of various age animals.

Key words: immune system, peptides, targeted action, cell cultures, ageing.

Введение. Иммунная система осуществляет защитную функцию и участвует в сохранении гомеостаза на органно - тканевом и молекулярно-клеточном уровне. В поддержании функциональной активности и взаимодействия иммунной системы с нервной и эндокринной системами участвуют сигнальные молекулы. Древнейшими в эволюции и одними из наиболее многофункциональных сигнальных молекул являются регуляторные пептиды. Так, нейропептиды VIP (vasoactive intestinal peptide) и CGRP (calcitonin gene related peptide) синтезируются в иммунных клетках, а с возрастом уровень их экспрессии снижается [1, 12].

Возрастная инволюция иммунной системы характеризуется снижением иммуногенеза в тимусе и селезенке, что приводит к развитию онкологической и аутоиммунной патологии. Основным проявлением старения селезенки является изменение миграции В-лимфоцитов, нарушение процессов клеточного обновления и синтеза ряда сигнальных молекул (опиоидные пептиды, пролактин, VIP, окситоцин, аргинин-вазопрессин, соматостатин, нейрофизин) [2].

Таким образом, в основе старения иммунной системы лежит снижение синтеза регуляторных пептидов и ослабление чувствительности к ним клеток-мишеней [11]. Нарушение пептидной регуляции снижает резистентность иммунных клеток к дестабилизирующим факторам внешней и внутренней среды и может являться одним из механизмов ускоренного старения и развития ряда заболеваний.

Установлено, что применение пептидных биорегуляторов (ПБ), разработанных в Санкт-Петербургском институте биорегуляции и геронтологии, позволяет восстановить функциональную активность иммунной системы при возрастной инволюции.

Применение ПБ тимогена (Glu-Trp) и дипептида АВ-0 (Lys-Glu) оказалось эффективным при ряде заболеваний, связанных со снижением клеточного иммунитета: при химиотерапии у онкологических больных, инфекционно-воспалительных заболеваниях и в постоперационном периоде [5]. Дипептид АВ-0 способен проникать в ядро и ядрышко клеток и связываться с ДНК и гистонами [6]. Молекулярный механизм иммунопротекторного действия ПБ связан с их способностью стимулировать пролиферацию и дифференцировку тимоцитов [3, 4, 9, 10].

Цель исследования: сравнительное изучение действия ПБ на экспрессию сигнальных молекул в культурах клеток селезенки животных разного возраста.

Материал и методы. Селезенку молодых (3 мес.) и старых (24 мес.) крыс линии Wistar разделяли на эксплантаты (фрагменты величиной около 1 мм³) и культивировали в чашках Петри в 3 мл питательной среды по описанной ранее методике [8]. Питательная среда включала в себя 35% среды Игла, 35% раствора Хенкса, 25% фетальной телячьей сыворотки, 0,6% глюкозы, 0,5 ед/мл инсулина и 100 ед/мл гентамицина. Эксплантаты селезенки в течение 3 сут культивировали в инкубаторе при температуре 36,7°C в условиях постоянного поступления 5% CO₂. Культуры клеток селезенки были разделены на 4 группы: контрольную – с введением физиологического раствора и 3 экспериментальные – с добавлением пептидов АВ-0 (исследуемый пептид), Т-33 (отрицательный контроль) и тимоген (положительный контроль). Пептиды добавляли в культуры в следующих концентрации 0,05 нг/мл.

Для изучения экспрессии сигнальных молекул органотипические культуры фиксировали охлажденным до -20°C 96% этиловым спиртом и проводили пермеабиллизацию клеток 0,5% Triton X-100. Для иммуноцитохимического окрашивания клеток селезенки использовали первичные моноклональные антитела к Ki67 (Novocastra, 1:50), p53 (Novocastra, 1:50), CD5 (Dako, 1:50), CD20 (Dako, 1:50) и CD68 (Dako, 1:50). Для оценки результатов иммуноцитохимического окрашивания проводили морфометрическое исследование с использованием системы компьютерного анализа микроскопических изображений, состоящей из микроскопа Nikon Eclipse E400, цифровой камеры Nikon DXM1200, персонального компьютера на базе Intel Pentium 4 и программного обеспечения «Videotest Morphology 5.2». Относительную площадь

экспрессии рассчитывали, как отношение площади, занимаемой иммунопозитивными клетками, к общей площади клеток в поле зрения и выражали в процентах.

Статистическую обработку результатов выполняли с помощью программы Statistica 7.0 с предварительной проверкой соответствия рассматриваемых переменных нормальному распределению по критерию Шапиро–Уилка. Для проверки статистической однородности нескольких выборок были использован непараметрический Н-критерий Крускала–Уоллиса.

Результаты исследования и их обсуждение. В культурах клеток селезенки молодых крыс пептид АВ-0 повышал экспрессию маркеров CD20 и CD68 – площадь экспрессии возрастала соответственно на 21% и 35% (табл. 1). Тимоген способствовал увеличению площади экспрессии CD20 и CD68 в 1,6 раза. Пептид Т-33 в отличие от АВ-0 и тимогена не влиял на экспрессию маркеров иммунных клеток, что указывает на тканеспецифическое действие пептидов АВ-0 и тимогена.

Таблица 1.

Влияние пептидов на экспрессию сигнальных молекул в культуре клеток селезенки молодых крыс

Иммуноцитохимический маркер	Группа			
	Контроль	Пептид АВ-0	Тимоген	Пептид Т-33
Ki67	0,042±0,005	0,042±0,002	0,043±0,002	0,031±0,003*
p53	0,027±0,003	0,022±0,004	0,022±0,005	0,024±0,004
CD5	0,029±0,004	0,014±0,003*	0,025±0,006	0,024±0,004
CD20	0,028±0,009	0,034±0,030*	0,046±0,006*	0,023±0,004
CD68	0,020±0,003	0,027±0,020*	0,031±0,003*	0,019±0,002

*-p<0,05 – по сравнению с соответствующим показателем в контроле.

В культуре клеток селезенки старых крыс пептид АВ-0 индуцировал увеличение экспрессии CD20 в 1,4 раза и CD68 в 1,7 раза по сравнению с контролем. Под действием тимогена площадь экспрессии Ki67 возрастала в 2 раза, CD20 – в 2,5 раза и

CD68 – в 1,6 раза (табл. 2). Пептид Т-33 не влиял на синтез исследуемых маркеров иммунокомпетентных клеток. Таким образом, в культурах клеток, полученных от старых животных, тимоген и пептид АВ-0 стимулировали иммуногенез, а пептид Т-33, специфичный к нервной ткани, не обладал таким эффектом.

Таблица 2.

Влияние пептидов на экспрессию сигнальных молекул в культуре клеток
селезенки старых крыс

Иммуноцитохимический маркер	Группа			
	Контроль	Пептид АВ-0	Тимоген	Пептид Т-33
Ki67	0,020±0,006	0,022±0,002	0,04±0,005*	0,018±0,003
p53	0,031±0,003	0,026±0,004	0,030±0,004	0,025±0,005
CD5	0,022±0,003	0,013±0,003*	0,021±0,005	0,024±0,004
CD20	0,032±0,010	0,044±0,030*	0,080±0,007*	0,029±0,004
CD68	0,017±0,003	0,028±0,050*	0,027±0,002*	0,012±0,004

*- $p < 0,05$ – по сравнению с соответствующим показателем в контроле.

Заключение. Полученные данные свидетельствуют о выраженном тканеспецифическом действии ПБ на экспрессию сигнальных молекул в культурах клеток селезенки молодых и старых животных, что согласуется с полученными ранее данными об иммунопротекторном действии коротких пептидов на тимус [7]. Пептиды АВ-0 и тимоген обладают стимулирующим эффектом в отношении иммунных клеток селезенки. Макрофаги селезенки осуществляют утилизацию эритроцитов, а В-лимфоциты участвуют в противоопухолевой и антивирусной защите организма. Следовательно, пептидергическая активация данных субпопуляций иммунокомпетентных клеток при старении организма открывает новые пути к поддержанию иммуногенеза при возрастной патологии.

Список литературы.

1. Кветной И.М. Структурно-функциональное сходство пинеалоцитов и клеток тимуса / И.М. Кветной, В.О. Полякова, Н.С. Линькова // Иммунология. - 2011. - Т. 32, № 3. - С. 131 -134.
2. Кузнецова Е.П. Селезенка: онтогенез и старение / Е.П. Кузнецова, Н.С. Линькова, А.В. Дудков, М.А. Войцеховская // Геронтологический журнал им. В.Ф. Купревича. - 2011. - Т. 2, № 2. - С. 9 - 16.
3. Хавинсон В.Х. Морфофункциональные основы пептидной регуляции старения / В.Х. Хавинсон, Н.С. Линькова, А.В. Трофимов [и др.]. // Успехи современной биологии. - 2011. - Т. 131, № 2. - С. 115 - 121.
4. Хавинсон В.Х., Серый С.В., Малинин В.В. Средство, обладающее иммуномодулирующей активностью // Патент РФ № 2080120. 1997.
5. Anisimov V.N. Peptide bioregulation of aging: results and prospects / V.N. Anisimov, V.Kh. Khavinson // Biogerontology. - 2010. № 11. - P. 139 - 149.
6. Fedoreyeva L.I. Interaction of Short Peptides with FITC-Labeled Wheat Histones and Their Complexes with Deoxyribooligonucleotides / L.I. Fedoreyeva, T.A. Smirnova, G.Ya. Kolomijtseva [et al.]. // Biochemistry. - 2013. - Vol. 78, № 2. - P. 166 - 175.
7. Khavinson V.Kh. Tissue-Specific Effects of Peptides / V.Kh. Khavinson // Bulletin of Experimental Biology and Medicine. - 2001. - Vol. 132, № 2. - P. 807 - 808.
8. Khavinson V.Kh. A Method of Creating a Cell Monolayer Based on Organotypic Culture for Screening of Physiologically Active Substances / V.Kh. Khavinson, N.S. Linkova, V.E. Pronyaeva [et al.]. // Bulletin of Experimental Biology and Medicine. - 2012. - Vol. 153, № 5. - P. 795 - 799.
9. Khavinson V.Kh. Peptides Regulate Cortical Thymocytes Differentiation, Proliferation, and Apoptosis / V.Kh. Khavinson, V.O. Polyakova, N.S. Linkova [et al.]. // Journal of Amino Acids. - 2011. - Vol. 2011. - P. 1 - 5.
10. Morozov V.G., Khavinson V.Kh. Thymus-gland preparation and method for producing same // United States Patent № 5, 070, 076. 1991.
11. Straub R.H. The process of aging changes the interplay of the immune, endocrine and nervous systems / R.H. Straub, M. Cutolo, B. Zietz [et al.]. // Mech Ageing Dev. - 2001. - Vol. 122, № 14. - P. 1591 - 1611.

12. Wimalawansa S.J. Age-related changes in tissue contents of immunoreactive calcitonin gene-related peptide / S.J. Wimalawansa // *Aging*. - 1992. - Vol. 4, № 3. - P. 211 - 217.

Referenses.

1. Kvetnoi I.M., Polyakova V.O., Linkova N.S. *Immunologia*. 2011, Vol. 32, no. 3, pp. 131 - 134.
2. Kuznetsova E.P., Linkova N.S., Dudkov A.V., Voicechovskaia M.A. *Gerontologicheskii zhurnal im. V.F. Kuprevicha*. 2011, Vol. 2, no. 2, pp. 9 - 16.
3. Khavinson V.Kh., Linkova N.S., Trofimov A.V., Polyakova V.O., Sevostianova N.N., Kvetnoi I.M. *Yspechi sovremennoi biologii*. 2011, Vol. 131, no. 2, pp. 115 - 121.
4. Khavinson V.Kh., Serii S.V., Malinin V.V. Sredstvo, obladajushee immunomodulirujushei aktivnost'ju. Patent RF № 2080120. 1997.
5. Anisimov V.N., Khavinson V.Kh. *Biogerontology*. 2010, no. 11, pp. 139 - 149.
6. Fedoreyeva L.I., Smirnova T.A., Kolomijtseva G.Ya., Khavinson V.Kh., Vanyushin B.F. *Biochemistry*. 2013, Vol. 78, no. 2, pp. 166 - 175.
7. Khavinson V.Kh. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 2001, Vol. 132, no. 2, pp. 807 - 808.
8. Khavinson V.Kh., Linkova N.S., Pronyaeva V.E., Chalisova N.I., Koncevaya E.A., Polyakova V.O., Kvetnaya T.V., Kvetnoy I.M., Yakovlev G.M. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 2012, Vol. 153, no. 5, pp. 795 - 799.
9. Khavinson V.Kh., Polyakova V.O., Linkova N.S., Dudkov A.V., Kvetnoy I.M. *Journal of Amino Acids*. 2011, Vol. 2011, pp. 1 - 5.
10. Morozov V.G., Khavinson V.Kh. Thymus-gland preparation and method for producing same. United States Patent N 5, 070, 076. 1991.
11. Straub R.H., Cutolo M., Zietz B., Scholmerich J. *Mech Ageing Dev*. 2001, Vol. 122, no. 14, pp. 1591 - 1611.
12. Wimalawansa S.J. *Aging*. 1992, Vol. 4, no. 3, pp. 211 - 217.