БИОГЕРОНТОЛОГИЯ

ВЛИЯНИЕ ТРИПЕПТИДОВ НА ЛИМФОИДНЫЕ И СТВОЛОВЫЕ КЛЕТКИ

В.Х.Хавинсон*, И.С.Никольский, В.В.Никольская, Д.А.Зубов, С.Н.Галицкая, Л.И.Тарануха, Я.-М.А.Семенова, Н.А.Лисица, Н.С.Линькова*, Г.М.Бутенко

**Санкт-Петербургский институт биорегуляции и геронтологии СЗО РАМН; Институт генетической и регенеративной медицины НАМН Украины, Киев*

Трипептиды Т-36 и в особенности Т-38 в концентрациях 0.1, 1 и 10 нг/мл угнетают пролиферацию первично-трипсинизированных эмбриональных мезенхимальных стволовых клеток, перевиваемых фибробластов крыс линии КФ-1 и линии клеток эритромиелоза человека К-562. Угнетение пролиферации под действием трипептидов, направленное на эмбриональные и иммортализованные клетки, может указывать на их противоопухолевую активность. Трипептиды не влияют на выживаемость лимфоцитов, их адгезивную, цитотоксическую и индуцированную пролиферативную активность, а Т-36 не изменяет пролиферативную способность клеток эритромиелоза К-562. Трипептиды не изменяют поглотительную активность гранулоцитов, их спонтанную и индуцированную бактерицидность.

Кроме того, Т-36 в концентрации 0.1 нг/мл усиливает спонтанную пролиферативную активность нормальных лимфоцитов, что может указывать на стимулирующее влияние трипептидов на неопухолевые иммунные клетки взрослых людей.

Ключевые слова: *трипептиды, лимфоидные клетки, мезенхимальные стволовые клетки, пролиферация*

Регуляция процессов пролиферации и дифференцировки клеток лимфоидного ряда и мезенхимальных стволовых клеток (МСК) является одной из актуальных задач иммунологии старения [1,3,9,10]. Изучение свойств пептидных геропротекторов, синтезированных в Санкт-Петербургском институте биорегуляции и геронтологии СЗО РАМН, и в частности трипептидов Т-36 и Т-38, показало возможность применения коротких пептидов для регуляции пролиферативной активности иммунных и стволовых клеток человека и животных [1,5,6,8]. Однако влияние обоих пептидных биорегуляторов на различные функции лимфоцитов и создающих для них условия благоприятного микроокружения МСК до сих пор недостаточно изучено.

Целью данной работы являлось исследование влияния трипептидов Т-36 и Т-38 на стволовые и лимфоидные клетки.

Адрес для корреспонденции: miayy@yandex.ru. Линькова Н.С.

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

В исследовании были использованы следующие клеточные культуры: лейкоциты периферической крови человека; перевиваемая культура клеток эритромиелоза человека (К-562); перевиваемая культура фибробластов крыс (КФ-1); первично-трипсинизированная культура эмбриональных кожно-мышечных МСК крыс.

Для культивирования применяли растворы Хенкса, трипсина, версена (НПП "БиоТестЛаборатория"), МТТ ("ПанЭко"), Histopaque-1077, трипанового синего, фитогемагглютинина (ФГА) и ДМСО ("Sigma"). Питательная среда для культивирования МСК включала среду DMEM/F12, 10% ЭТС, 2 мМ L-глутамина и 0.1 мМ HEPES Na-соль. Питательная среда для культивирования клеток К-562 состояла из среды RPMI-1640, 10% ЭТС, 2 мМ L-глутамина, 0.1 мМ HEPES Na-соль, 100 Ед/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина, 100 мкг/мл канамицина и 10 мкг/мл флуконазола.

Первично-трипсинизированные МСК 14-дневных крысиных эмбрионов изолировали, комбинируя механическую и ферментативную обработку. Действие трипсина прекращали путем добавления в раствор ЭТС. Отмытые клетки пипетировали в питательной среде и засевали ими культуральные флаконы (25 см^2), которые помещали в CO_2-инкубатор при 37°С и 5% CO_2. Пассирование осуществляли в отношении 1:5 каждые 3 сут с помощью смеси растворов трипсина и версена. Аналогичным образом вели и поддерживали перевиваемую культуру крысиных фибробластов КФ-1. Суспензионную культуру клеток К-562 поддерживали в пенициллиновых флаконах. Пассаж клеток проводили каждые 4-5 сут, ресуспендируя 3×10^5 клеток в 5 мл питательной среды. Для оценки пролиферативной активности культур подсчет клеток осуществляли в камере Горяева.

Пролиферативную активность лимфоцитов изучали в реакции бласттрансформации (РБТЛ) на ФГА. Активность МСК костного мозга мышей определяли по способности образовывать колонии фибробластов в тесте определения КОЕ (КОЕ-Ф) в монослойных культурах [7].

Естественную цитотоксическую активность лимфоцитов оценивали колориметрически по методике, основанной на способности митохондриальных ферментов жизнеспособных клеток переводить добавленную в культуру клеток МТТ-тетразолиевую соль желтого цвета в кристаллический МТТ-формазан лилового цвета [11]. В качестве мишеней использовали клетки К-562. Цитотоксический индекс рассчитывали по формуле:

$$ЦИ=100-(\frac{ОП_{км,кэ}-ОП_{кэ}}{ОП_{км}}\times100),$$

где $ОП_{км,кэ}$ — оптическая плотность клеток-мишеней, инкубированных с клетками-эффекторами (лимфоцитами); $ОП_{км}$ — оптическая плотность клеток-мишеней; $ОП_{кэ}$ — оптическая плотность клеток-эффекторов.

Адгезивную активность лимфоцитов человека оценивали по способности их CD2-молекулы осуществлять зависимое от состояния цитоскелета взаимодействие с поверхностной структурой эритроцитов барана, гомологичной CD58-молекуле [4].

Поглотительную активность нейтрофилов исследовали по способности этих клеток поглощать инактивированные нагреванием клетки *St. aureus*, а для определения бактерицидной активности нейтрофилов использовали НСТ-тест, основанный на способности фагоцитов утилизировать в процессе активации кислород с последующим образованием высокореактивных свободных кислородных радикалов с отложением в клетках темно-синих гранул диформазана [2].

Влияние Т-36 (H-Glu-Asp-Pro-OH) и Т-38 (H-Lys-Glu-Asp-OH) изучали в конечных концентрациях 0.01, 0.1, 1, 10, 100 и 1000 нг/мл. Трипептиды вносили в культуральные среды на следующие временные промежутки: на 18-20 ч при исследовании выживаемости и изучении цитотоксической активности лимфоцитов; на 2 ч при определении их адгезивной активности; на 72 ч при исследовании РБТЛ; на 2 ч при определении поглотительной и бактерицидной активности гранулоцитов; в культуру клеток К-562 пептиды вносили на 18-20 ч. В первично-трипсинизированную культуру эмбриональных МСК крыс и перевиваемую культуру крысиных фибробластов трипептиды вносили на 2 сут; при исследовании КОЕ-Ф препараты присутствовали в культуре 14 сут.

Статистическую обработку полученных результатов проводили с помощью непараметрического критерия Мана—Уитни.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Выживаемость лимфоцитов при введении в культуру Т-36 и Т-38 во всех исследуемых концентрациях, кроме максимальной, не отличалась от контроля. При концентрации Т-38 1000 нг/мл этот показатель достоверно снижался и составил 94.8% ($p<0.05$). Трипептиды не влияли на адгезивную и цитотоксическую активность лимфоцитов и на поглотительную и бактерицидную активность гранулоцитов. Не отмечалось также и действия препаратов на способность клеток костного мозга мышей образовывать колонии фибробластов.

ФГА-индуцированная пролиферативная активность лимфоцитов под воздействием Т-38 не изменялась. Однако при воздействии Т-36 в концентрации 1.0 нг/мл отмечалось усиление спонтанной РБТЛ с 2.3% в контроле до 10.0% ($p<0.05$).

С другой стороны, Т-36 не влиял на пролиферацию перевиваемой культуры фибробластов и в первично-трипсинизированной культуре эмбриональных МСК крыс при низкой плотности посадки клеток (3×10^3/см^2). При увеличении плотности клеток до 5×10^3/см^2 Т-36 достоверно снижал пролиферативную активность МСК в 3 концентрациях 0.1, 1, 10 нг/мл (табл. 1).

Т-38 обладал более выраженным ингибирующим действием на пролиферацию эмбриональных МСК по сравнению с Т-36. Т-38 снизил способность МСК к пролиферации не только при высокой плотности посадки клеток (5×10^3/см^2) в концентрациях 0.1, 1 и 10 нг/мл, но и оказывал антипроли-

ферративное действие при низкой плотности посадки МСК в концентрациях 0.1 и 1 нг/мл (табл. 2). Кроме того, Т-38 ингибировал пролиферацию в перевиваемой культуре фибробластов крыс как при низкой плотности посева клеток в концентрациях 0.1, 1 и 10 нг/мл, так и при высокой плотности посева в концентрациях 1 и 10 нг/мл (табл. 3). В концентрациях 0.1, 100 и 1000 нг/мл Т-38 также подавлял пролиферацию культуры клеток эритромиелоза человека К-562 (табл. 4). При этом Т-36 не влиял на пролиферативную способность культуры фибробластов и эритромиелоза человека.

Таким образом, Т-36 и Т-38 дозозависимо угнетают пролиферацию культур эмбриональных МСК крыс, перевиваемых иммортализованных фибробластов крыс и иммортализованной линии клеток эритромиелоза человека К-562 и не подавляют формирование колоний фибробластов и РБТЛ. Более того, при минимальной из исследованных концентраций Т-36 (0.1 нг/мл) показано достоверное усиление спонтанной пролиферативной активности нормальных лимфоцитов, что может указывать на стимулирующее влияние трипептидов на неопухолевые иммунные клетки взрослых людей. Все это позволяет предположить, что основным объектом антипролиферативного действия трипептидов могут являться эмбриональные и иммортализованные клетки. Угнетение пролиферации под действием трипептидов, направленное на эмбриональные и иммортализованные клетки, может указывать на их противоопухолевую активность. Установлено, что трипептиды не влияют на выживаемость лимфоцитов, их адгезивную, цитотоксическую и ФГА-индуцированную пролиферативную активность, а также поглотительную активность гранулоцитов, их спонтанную и индуцированную бактерицидность.

Полученные данные показали, что трипептиды оказывают различное специфическое действие на клеточном уровне, подавляя пролиферативную активность иммортализованных и эмбриональных клеток и в то же время стимулируя пролиферацию

Таблица 1. Влияние Т-36 на пролиферацию в первично-трипсинизированной культуре эмбриональных МСК крыс (%; *M*±*m*)

Исходное число клеток	Концентрация Т-36, нг/мл					
	0.01	0.1	1	10	100	1000
3×10^3/см^2	98.2±4.5 (88-120)	97.0±2.9 (88-106)	96.5±6.6 (77-124)	91.0±9.8 (49-120)	96.2±10.3 (53-132)	96.8±9.7 (61-141)
15×10^3/см^2	96.5±3.2 (86-109)	92.0±2.4* (83-98)	91.3±2.3* (82-98)	88.5±2.4* (78-96)	91.2±5.7 (66-106)	91.5±4.7 (75-106)

Примечание. *Здесь и в табл. 2-4: в скобках — пределы колебаний. *p<0.05 по сравнению с контролем, принятым за 100%.*

Таблица 2. Влияние Т-38 на пролиферацию в первично-трипсинизированной культуре эмбриональных МСК крыс (%; *M*±*m*)

Исходное число клеток	Концентрация Т-38, нг/мл					
	0.01	0.1	1	10	100	1000
3×10^3/см^2	94.0±6.2 (75-120)	85.5±4.1* (66-95)	86.3±3.4* (71-96)	78.5±4.5* (65-95)	89.5±9.8 (52-120)	83.0±10.3 (40-109)
15×10^3/см^2	98.5±2.8 (89-110)	97.3±2.5 (87-106)	91.0±2.7* (81-99)	80.7±8.3* (40-99)	87.2±9.4 (43-110)	90.78±8.9 (53-120)

Таблица 3. Влияние Т-38 на пролиферацию в перевиваемой культуре фибробластов крыс (%; *M*±*m*)

Исходное число клеток	Концентрация Т-38, нг/мл					
	0.01	0.1	1	10	100	1000
3×10^3/см^2	99.8±2.3 (89-106)	86.5±3.4* (75-98)	91.8±1.8* (87-99)	89.3±2.3* (84-98)	105.8±6.3 (88-138)	98.3±2.6 (89-109)
15×10^3/см^2	106.8±7.4 (86-443)	106.3±7.1 (95-145)	94.3±1.9* (89-103)	95.3±2.2* (88-103)	106.8±7.6 (91-145)	90.8±4.3 (94-125)

Таблица 4. Влияние Т-38 на пролиферацию в культуре клеток эритромиелоза человека К-562 (%; *M*±*m*)

Показатель	Концентрация Т-38, нг/мл					
	0.01	0.1	1	10	100	1000
Количество клеток	101.8±4.5 (72-130)	91.7±4.0* (65-114)	90.5±5.3 (56-129)	95±4.8 (62-123)	91.3±3.5* (69-114)	92.5±3.5* (70-112)

лейкоцитов человека. Это позволяет отнести исследованные трипептиды в основном к регуляторам пролиферации с положительной направленностью у нормальных клеток и отрицательной — у эмбриональных и иммортализованных, что приближает такие трипептиды к идеальным средствам онкоиммунотерапии.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Линькова Н.С., Полякова В.О., Трофимов А.В. и др.* // Бюл. экспер. биол. 2011. Т. 151, № 2. С. 203-206.
2. *Маянский А.Н., Маянский Д.Н.* Очерки о нейтрофиле и макрофаге. Новосибирск, 1989.
3. *Никольский И.С., Хойзер П., Никольская В.В. и др.* // Імунологія та алергологія. 1998. № 3. С. 48-65.
4. *Ярилин А.А.* Основы иммунологии. М., 1999.
5. *Anisimov V.N., Bondarenko L.A., Khavinson V.Kh.* // Ann. N Y Acad. Sci. 1992. Vol. 673. P. 53-57.
6. *Anisimov V.N., Khavinson V.Kh.* // Biogerontology. 2010. Vol. 11, N 2. P. 139-149.
7. *Friedenstein A.J., Chailakhian R.K., Lalykina K.S.* // Cell Tissue Kinet. 1970. Vol. 3. P. 393-403.
8. *Grigor'ev E.I., Khavinson V.Kh., Malinin V.V. et al.* // Bul. Exp. Biol. Med. 2003. Vol. 136, N 2. P. 150-154.
9. *Khavinson V., Bondarev I., Butyugov A., Smirnova T.* // The Biochemical Society. 2004. P. 15.
10. *Khavinson V.Kh., Malinin V.V.* Gerontological aspects of genome peptide regulation. Basel, 2005.
11. *Mossman T.* // J. Immunol. Methods. 1983. Vol. 65, N 1-2. P. 55-63.

Получено 10.03.10.