

ПЕПТИДЕРГИЧЕСКАЯ СТИМУЛЯЦИЯ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ ИММУННЫХ КЛЕТОК ЭПИФИЗА

Н.С.Линькова¹, В.Х.Хавинсон^{1,2}, Н.И.Чалисова^{1,2}, А.С.Катанугина², Е.А.Концевая¹

¹Санкт-Петербургский институт биорегуляции и геронтологии СЗО РАМН;
²Институт физиологии им. И.П.Павлова РАН, Санкт-Петербург

Изучали клеточный состав лимфоидной ткани эпифиза и его способность к дифференцировке и пролиферации под влиянием пептидов. Показано, что лимфоидный компонент эпифиза в органотипической культуре в большей степени представлен малодифференцированными CD5⁺-лимфоцитами, тогда как зрелые Т- и В-клетки составляют его меньшую часть. Дипептид вилон стимулирует дифференцировку предшественников лимфоцитов в Т-хелперы, цитотоксические Т-лимфоциты и В-клетки, тогда как тетрапептид эпиталон стимулирует их дифференцировку только в направлении В-клеточного звена. Трипептид везуген не влияет на способность иммунных клеток эпифиза к дифференцировке, но усиливает их способность к пролиферации. Таким образом, дипептид вилон является индуктором дифференцировки иммунных клеток эпифиза, которые могут играть важную компенсаторную роль при возрастной атрофии центрального органа иммунной системы — тимуса.

Ключевые слова: дифференцировка, лимфоциты, короткие пептиды, культура клеток эпифиза

Нейроиммуноэндокринная система — важнейший регулятор гомеостаза, а ее центральные органы — вилочковая (тимус) и пинеальная (эпифиз) железы [1,2,6]. Поскольку эпифиз и тимус — органы единой нейроиммуноэндокринной системы, в последние годы большое внимание уделяется изучению сходных процессов и сигнальных взаимодействий данных органов [5,6]. Так, показано, что в пинеальной и вилочковой железе секретируется нейропептид CGRP (calcitonin gene related peptide), транскрипционный фактор pCREB и специфические белки, участвующие в ремоделировании межклеточного матрикса MMP2 и MMP9 (matrix metalloproteinase) [6]. Тесная связь эпифиза и тимуса также подтверждается данными, свидетельствующими о том, что 20% площади эпифиза занимает лимфоидная ткань, представленная лимфоцитами, секретирующими цитокины, сходные с экспрессирующимися в тимусе [3,6]. Кроме того, верифицированная в ткани эпифиза MMP2 в большей степени секретируется иммунными клетками. При возрастной инволюции тимуса его функции делегируются лимфоидной ткани в других органах, одним из которых может быть пинеальная железа [4]. Лимфоидный компонент эпифиза представлен Т- и В-лимфоцитами, но большую его часть занимают малодифференцированные предшественники лимфоцитов,

которые при условии индукции дифференцировки могут являться дополнительным пулом иммунных клеток.

В процессы клеточной дифференцировки вовлечен ряд сигнальных механизмов, важнейшие из которых — цитокины и цитомедины [8,10,11]. В Санкт-Петербургском институте биорегуляции и геронтологии СЗО РАМН на основе анализа аминокислотной последовательности цитомединов, выделенных из разных тканей, синтезированы короткие пептиды, содержащие наиболее часто встречающиеся аминокислоты [9,12].

Ранее нами было показано, что ряд коротких пептидов стимулирует дифференцировку CD34⁺ стволовых клеток КМ эмбриона человека в CD14⁺-клетки (миелоциты), CD3⁺-клетки (предшественники Т-лимфоцитов), CD4⁺-клетки (Т-хелперы) и CD8⁺-клетки (цитотоксические Т-лимфоциты), а пептид везуген усиливает дифференцировку CD4⁺CD8⁺-тимоцитов в Т-хелперы [4]. Таким образом, установлена способность коротких пептидов стимулировать дифференцировку клеток в центральных органах иммуногенеза — КМ и тимусе, однако влияние пептидов на лимфоидный компонент периферических источников лимфопоэза, в частности эпифиза, остается неисследованным.

В связи с этим целью работы являлось изучение влияния ряда коротких пептидов на дифференцировку клеток лимфоидного компонента эпифиза в органотипической культуре.

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



МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

Эпифиз получали от 2-3-месячных самцов крыс Вистар, которых декапитировали с помощью гильотины. Пинеальную железу, выделенную у животных с помощью инструментов для глазной хирургии, помещали в стерильную чашку Петри и разделяли на эксплантаты (фрагменты около 1 мм³). Эксплантаты размещали по 10 штук на чашку Петри с коллагеновым покрытием (размер 35×2.5 мм, "Jet Biofil") и культивировали в 3 мл питательной среды, состоявшей из 45% раствора Хенкса, 45% среды Игла, 10% фетальной бычьей сыворотки, глюкозы (10 мг/мл) и гентамицина (0.5 мг/мл). Все эксплантаты ($n=40$) были разделены на 4 равные группы: контрольную (введение физиологического раствора) и три опытные, в каждой из которых применяли один из пептидов — эпиталон (Ala-Glu-Asp-Gly), везуген (Lys-Glu-Asp) или вилон (Lys-Glu) в концентрации 10 нг/мл. Все эксплантаты культивировали в CO₂-инкубаторе при 36.7°C в среде с 5% содержанием CO₂. Продолжительность культивирования составила 3 сут, т.к. такой временной интервал необходим для формирования зоны роста, состоящей из пролиферирующих и мигрирующих пинеалоцитов, фибробластов и иммунных клеток [7].

Для проведения иммуноцитохимического исследования в зоне роста эксплантатов культуры клеток эпифиза фиксировали 95% этиловым спиртом. Иммуноцитохимическую реакцию проводили с антителами к маркерам малодифференцированных лимфоцитов CD5 (1:30, "Novocastra"), Т-хелперов CD4 (готовые к использованию, "Novocastra"), цитотоксических Т-лимфоцитов CD8 (готовые к использованию, "Novocastra") и В-лимфоцитов CD20 (1:30, "Novocastra") с использованием стандартного одноэтапного протокола с высокотемпературной демаскировкой антигена в цитратном буфере (рН 6.0). В качестве вторичных антител использовали универсальный набор, содержащий биотинилированные антимышьи иммуноглобулины. Для визуализации реакции применяли комплекс авидина с биотинилированной пероксидазой хрена и диаминобензидином (ABC-kit, "Dako").

Морфометрический подсчет данных осуществляли с помощью системы компьютерного анализа микроскопических изображений, включавшей микроскоп "Nikon Eclipse E400", цифровую камеру "Nikon DXM1200", компьютер на базе "Intel Pentium 4" и программное обеспечение "VidiotestMorphology 5.0". В каждом случае анализировали 5 полей зрения при увеличении 100. Площадь экспрессии маркеров рассчитывали как отношение площади, занимаемой иммунопо-

зитивными клетками, к общей площади клеток в поле зрения и выражали в процентах. Площадь экспрессии является широко распространенным морфометрическим показателем, характеризующим количество клеток, на которых экспрессируется исследуемый маркер. Достоверность данных оценивали с помощью критерия Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В контрольных образцах культур эпифиза крыс распределение разных субпопуляций иммунных клеток составило 58:2:1:1 (CD5:CD20:CD4:CD8), что указывает на значительное преобладание недифференцированных лимфоцитов над всеми зрелыми популяциями клеток и подтверждает данные, полученные нами на аутопсийном материале эпифиза человека.

Дифференцировка иммунных клеток в органотипической культуре эпифиза зависела от структуры исследуемых пептидов.

Экспрессия маркера CD5 под воздействием виллона и эпиталона снижалась в 5 и 12 раз соответственно относительно контроля, тогда как везуген на экспрессию этого маркера не влиял (рис. 1, а). Таким образом, два из трех исследованных пептидов — вилон и эпиталон — могут быть кандидатами в индукторы дифференцировки. Экспрессия маркера CD20 в культуре клеток эпифиза увеличивалась относительно контроля под воздействием всех изучаемых пептидов: для виллона — в 25 раз, для везугена — в 32.5 раза и менее значительно для эпиталона — в 6 раз (рис. 1, б). Площадь экспрессии маркера Т-хелперов (CD4) не изменялась под воздействием эпиталона и увеличивалась при введении в культуру клеток эпифиза виллона и везугена (в 5.2 и 15 раз соответственно; рис. 1, в). Экспрессия маркера CD8 (цитотоксические Т-клетки) оставалась неизменной под влиянием везугена и эпиталона. Стимулирующее действие на экспрессию данного маркера оказывал только вилон, который способствовал усилению экспрессии CD8 в 11 раз относительно контрольного значения (рис. 1, г).

Сопоставляя влияние коротких пептидов на экспрессию разных маркеров иммунных клеток в эпифизе, можно предположить наличие влияния на направленность дифференцировки предшественников лимфоцитов.

Эпиталон способствовал уменьшению числа малодифференцированных CD5⁺-клеток при одновременном усилении экспрессии маркера В-лимфоцитов CD20 и не оказывал влияния на зрелые Т-лимфоциты с фенотипом CD4⁺ и CD8⁺. Представляется вероятным, что эпиталон способен стимулировать дифференцировку пред-



шественников лимфоцитов лишь в направлении В-клеток.

Везуген не оказывал воздействия на популяцию предшественников лимфоцитов, однако стимулировал увеличение экспрессии маркеров

CD4 и CD20. Таким образом, везуген не влияет на дифференцировку предшественников лимфоцитов в эпифизе, однако способствует усилению пролиферативной активности зрелых Т-хелперов и В-лимфоцитов. Эти данные согласуются с полу-

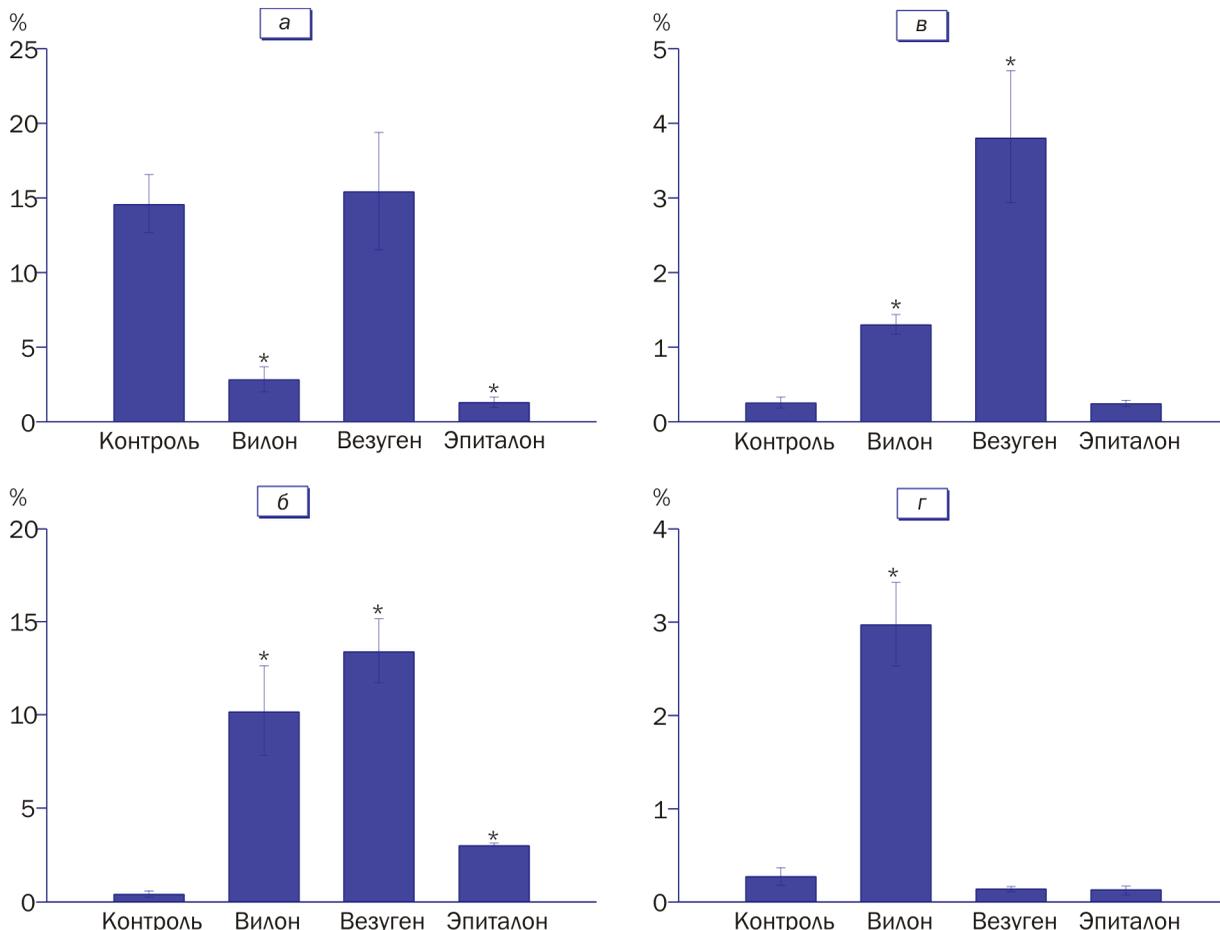


Рис. 1. Влияние коротких пептидов на экспрессию маркеров иммунных клеток в лимфоидном компоненте эпифиза. а – малодифференцированные CD5⁺-лимфоциты; б – CD20⁺ В-лимфоциты; в – CD4⁺ Т-хелперы; г – CD8⁺ цитотоксические Т-лимфоциты. По оси ординат – площадь экспрессии маркеров и иммунных клеток.

Здесь и на рис. 2: **p*<0.05 по сравнению с контролем.

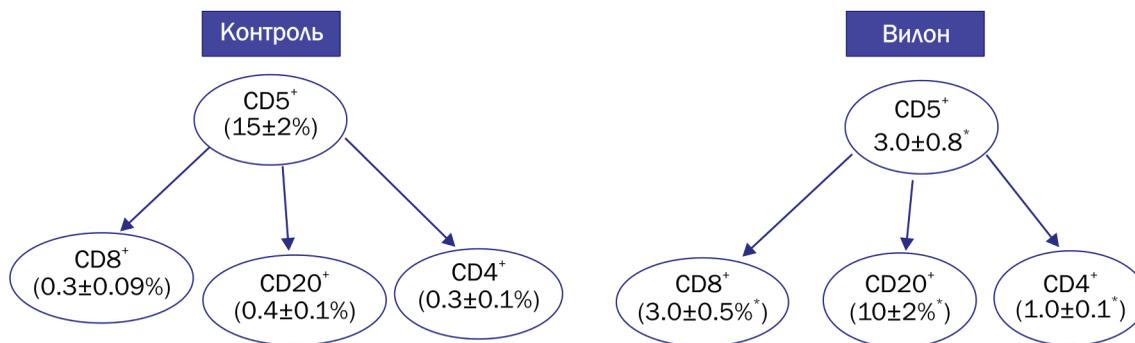


Рис. 2. Дипептид вилон стимулирует дифференцировку иммунных клеток.

Представлены значения площади экспрессии маркеров: CD5 – малодифференцированные лимфоциты, CD20 – В-лимфоциты, CD4 – Т-хелперы, CD8 – цитотоксические Т-лимфоциты.



ченными ранее результатами, свидетельствующими о стимулирующем влиянии данного трипептида на пролиферацию разных клеточных популяций.

Наиболее перспективным индуктором дифференцировки иммунных клеток эпифиза оказался вилон. Так, вилон значительно снижал экспрессию маркера недифференцированных лимфоцитов при одновременном усилении экспрессии маркеров всех исследуемых зрелых клеток — обеих форм Т-лимфоцитов и В-клеток, причем данный эффект во всех случаях многократно превышал результаты, полученные для контрольных культур (рис. 2). Таким образом, вилон не только оказался индуктором дифференцировки иммунных клеток эпифиза, но и продемонстрировал необычайно широкий спектр направления дифференцируемых клеток. Вероятно, наиболее выраженное влияние вилона на дифференцировку иммунных клеток лимфоидного компонента эпифиза объясняется тем, что данный дипептид синтезирован на основе цитомедина тималина, выделенного из ткани тимуса и обладающего выраженным иммуномодулирующим действием.

Полученные данные позволяют сделать вывод о том, что вилон индуцирует дифференцировку лимфоидной ткани эпифиза в Т- и В-лимфоциты, эпиталон стимулирует ее дифференцировку только в направлении В-клеток, а везуген

не влияет на дифференцировку, однако стимулирует пролиферацию Т-хелперов и В-клеток.

ЛИТЕРАТУРА

1. Гончарова Н.Д., Хавинсон В.Х., Лапин Б.А. Пинеальная железа и возрастная патология (механизмы и коррекция). СПб., 2007.
2. Коркушко О.В., Хавинсон В.Х., Шатило В.Б. Пинеальная железа: пути коррекции при старении. СПб., 2006.
3. Линькова Н.С., Полякова В.О., Трофимов А.В. и др. // Успехи геронтол. 2010. Т. 23, № 4. С. 543-546.
4. Линькова Н.С., Полякова В.О., Трофимов А.В. и др. // Бюл. экспер. биол. 2011. Т. 151, № 2. С. 203-206.
5. Линькова Н.С., Трофимов А.В., Полякова В.О. и др. // Успехи геронтол. 2011. Т. 24, № 1. С. 38-42.
6. Полякова В.О., Кветной И.М. // Нейроиммунология. 2009. Т. 7, № 1. С. 85-86.
7. Чалисова Н.И., Князькин И.В., Кветной И.М. Нейроиммуноэндокринные механизмы действия пептидов и аминокислот в тканевых культурах. СПб., 2005.
8. Anisimov V.N., Khavinson V.Kh. // Biogerontology. 2010. Vol. 11, N 2. P. 139-149.
9. Goncharova N.D., Vengerin A.A., Khavinson V.Kh., Lapin B.A. // Exp. Gerontol. 2005. Vol. 40, N 1-2. P. 51-57.
10. Khavinson V., Goncharova N., Lapin B. // NeuroEndocrinol. Lett. 2001. Vol. 22, N 4. P. 251-254.
11. Khavinson V.Kh., Lezhava T.A., Monaselidze J.R. et al. // Neuro Endocrinol. Lett. 2003. Vol. 24, N 5. P. 329-333.
12. Khavinson V.Kh., Malinin V.V. Gerontological aspects of genome peptide regulation. Basel (Switzerland), 2005.
13. Polyakova V.O., Linkova N.S., Pichugin S.A. // Bull. Exp. Biol. Med. 2010. Vol. 150, N 4. P. 468-470.