

ИММУНОМОДУЛИРУЮЩЕЕ ДЕЙСТВИЕ ВИЛОНА И ЕГО АНАЛОГА В КУЛЬТУРАХ КЛЕТОК ТИМУСА ЧЕЛОВЕКА И ЖИВОТНЫХ

Н.Н.Севостьянова², Н.С.Линькова², В.О.Полякова³, Н.А.Червякова², А.В.Костылев²,
А.О.Дурнова³, И.М.Кветной³, Абдулрагимов Р.И.², Хавинсон В.Х.^{1,2}

¹Институт физиологии им. И.П.Павлова РАН, Санкт-Петербург;

²Санкт-Петербургский институт биорегуляции и геронтологии;

³НИИ акушерства и гинекологии им. Д.О. Отта РАМН

В культурах клеток тимуса крысы и человека изучали молекулярные механизмы иммунопротекторного действия двух дипептидов — АВ-0 и R-1. Установлено, что оба пептида в культурах клеток тимуса индуцируют экспрессию маркера дифференцировки лимфоцитов CD5. При этом дипептид АВ-0 индуцирует дифференцировку только в направлении CD4⁺ клеток (Т-хелперов) и его эффект выражен слабее, чем дипептида R-1. Дипептид R-1 стимулирует дифференцировку CD5⁺ клеток в Т-хелперы и CD8⁺ (цитотоксические Т-клетки), что позволяет рассматривать его в качестве биологически активного вещества, обладающего иммуномодулирующими и антиаллергическими свойствами.

Ключевые слова: дипептиды, культура клеток, тимус, Т-лимфоциты

Тимус является центральным органом иммунной системы, играющим ведущую роль в формировании Т-клеточного иммунитета. Выраженное снижение функциональной активности тимуса у человека наблюдается с момента полового созревания и сопряжено с ранней инволюцией данного органа [10]. Применение коротких пептидов для восстановления функций тимуса — новое перспективное направление в иммунологии и фармакологии. Установлено, что ди- и трипептиды эффективны при возрастном и индуцированном радиацией снижении функций тимуса, иммунопатологических состояниях, связанных с высокой физической нагрузкой у спортсменов, а также при аутоиммунных и онкологических заболеваниях [1,2,4,6]. В настоящее время изучение молекулярных механизмов действия коротких иммуномодулирующих пептидов является важным направлением молекулярной биологии, позволяющим выявить мишени действия данных биологически активных веществ и установить показания к их применению. Установлено, что некоторые короткие пептиды индуцируют дифференцировку иммунных клеток, снижают уровень апоптоза и стимулируют их пролиферацию [5,7,8].

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

Целью работы явилось сравнительное изучение влияния дипептидов на экспрессию маркеров лимфоцитов в культурах клеток тимуса крысы и человека.

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

Первичные культуры клеток тимуса 3-месячных крыс Вистар и эмбриона человека выделяли в лаборатории иммунологии старения Санкт-Петербургского института биорегуляции и геронтологии. Эмбриональный материал тимуса (16-24 нед гестации) получен в НИИ акушерства и гинекологии им. Д.О.Отта РАМН (Санкт-Петербург). Клетки культивировали на чашках Петри диаметром 3.5 см, обработанных раствором желатина ("Биолот") в CO₂-инкубаторе в стандартных условиях (5% CO₂, 37°C), в среде, содержащей 15% фетальной бычьей сыворотки, 82.5% RPMI, 1.5% HEPES-буфера с добавлением L-глутамина. Для пересева клеток в соотношении 3:1 использовали раствор трипсина-версена. Культуры делили на 3 группы: в 1-й группе (контрольной) вводили 0.9% раствор NaCl, во 2-й группе добавляли дипептид АВ-0 (0.05 нг/мл), а в 3-й — дипептид R-1 (0.05 нг/мл). Дипептид АВ-0 был выбран в качестве пептида сравнения (его иммуномодулирующее действие хорошо изучено). Ранее было установлено, что дипептид АВ-0 способен регулировать некоторые гены, стимулировать активацию тимоцитов в культуре клеток



(повышать экспрессию молекул HLA-DR и CD54), нормализовывать реакцию бласттрансформации лимфоцитов (РБТЛ) и в 2 раза снижать частоту респираторных инфекций у пожилых пациентов [1,3,9]. Дипептид R-1 является новым биологически активным веществом, способствующим повышению пролиферации ткани тимуса и селезенки в органотипической культуре молодых и старых крыс.

При каждом пассаже в питательную среду в культуры клеток добавляли раствор с соответствующим пептидом. Пассирование проводили через 3 сут, когда культура достигала монослоя. Культивировали до 3-го пассажа, после чего клетки рассеивали на 24-луночный планшет ("Биолот") и проводили иммуноцитохимическое окрашивание.

Для иммуноцитохимического исследования использовали первичные моноклональные антитела к маркерам CD4 (Т-хелперы), CD5 (предшественники Т-и В-лимфоцитов) и CD8 (цитотоксические Т-лимфоциты) в разведении 1:50 и вторичные антитела — биотинилированные антимышиные иммуноглобулины (все реагенты "Novocastra"). Пермеабелизацию проводили с применением 0.1% тритона X-100. Визуализацию реакции выполняли с применением пероксидазы хрена и диаминобензидаина ("EnVision Detection System", Peroxidase/DAB, Rabbit, Mouse). Результаты иммуноцитохимического окрашивания оценивали морфометрическим методом на микроскопе "Nikon Eclipse" E400 с помощью цифровой камеры "Nikon" DXM1200 и программного обеспечения "Videotest Morphology 5.2". В каждом случае анализировали 5 полей зрения при увеличении 200. Площадь экспрессии рассчитывали как отношение площади, занимаемой иммунопозитивными клетками, к общей площади клеток в поле зрения и выражали в процентах. Этот параметр характеризует количество клеток, на поверхности которых экспрессируется исследуемый трансмембранный гликопротеин.

Статистическую обработку данных выполняли с помощью программы "Statistica 7.0". Для сравнения и оценки межгрупповых различий использовали непараметрический *U* критерий Манна—Уитни, который является наиболее точным методом для сравнения выборок, включающих около 10-15 элементов. Различия считали статистически значимыми при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Экспрессия исследуемых гликопротеинов CD4, CD5 и CD8 была верифицирована во всех контрольных и экспериментальных образцах культур клеток тимуса крысы и человека.

Площадь экспрессии маркера CD4 в культуре клеток тимуса крысы достоверно увеличивалась под воздействием дипептида R-1 на 35% по сравнению с контролем, тогда как дипептид АВ-0 не оказывал такого эффекта (таблица). В культуре клеток тимуса эмбриона человека под влиянием дипептидов АВ-0 и R-1 площадь экспрессии трансмембранного гликопротеина CD4 увеличивалась на 31 и 56% соответственно по сравнению с контролем (таблица; рис. 1, а-в). Таким образом, дипептид R-1 оказывает более выраженный стимулирующий эффект на Т-хелперы в тимусе крысы и человека, чем дипептид АВ-0.

Пептид R-1 усиливал экспрессию маркера CD8 на 59% по сравнению с контролем в культуре клеток тимуса крысы, однако не влиял на данный показатель в культуре клеток тимуса эмбриона человека (таблица; рис. 2, а-в).

Из всех исследуемых маркеров дипептиды оказывали наибольшее индукционное воздействие на экспрессию молекулы CD5, что свидетельствует об их влиянии на процессы дифференцировки клеток тимуса. Под воздействием дипептида АВ-0 площадь экспрессии маркера CD5 в культурах клеток тимуса крысы и эмбриона человека увеличилась на 78 и 45% соответственно по сравнению с контролем (таблица; рис. 3, а, б).

Влияние дипептидов на площадь экспрессии маркеров иммунокомпетентных клеток в клеточных культурах тимуса

Группа	Площадь экспрессии маркеров, %					
	культура клеток тимуса крысы			культура клеток тимуса эмбриона человека		
	CD4	CD8	CD5	CD4	CD8	CD5
1-я группа (контроль)	2.62±0.38	1.96±0.31	2.05±0.31	2.36±0.24	2.24±0.35	1.94±0.24
2-я группа	3.17±0.51	2.26±0.24	3.64±0.51*	3.10±0.31*	2.86±0.28	2.82±0.37*
3-я группа	3.54±0.47*	3.12±0.41*	2.78±0.47	3.68±0.56*	2.68±0.61	3.46±0.49*

Примечание. * $p < 0.05$ по сравнению с контролем.



Дипептид R-1 стимулировал экспрессию маркера CD5 на 78% только в культуре клеток тимуса эмбриона человека (таблица; рис. 3, а, в).

Полученные результаты свидетельствуют о том, что молекулярной мишенью действия дипептида АВ-0 являются маркеры лимфоцитов

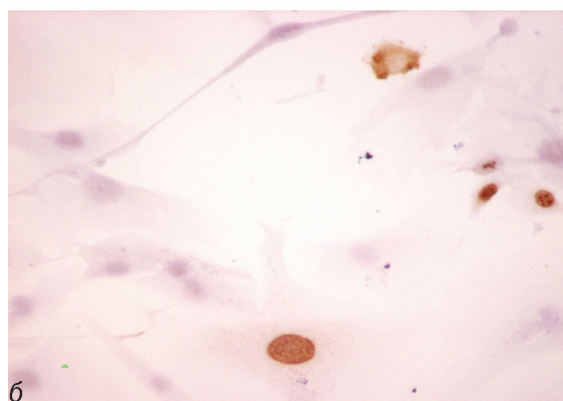
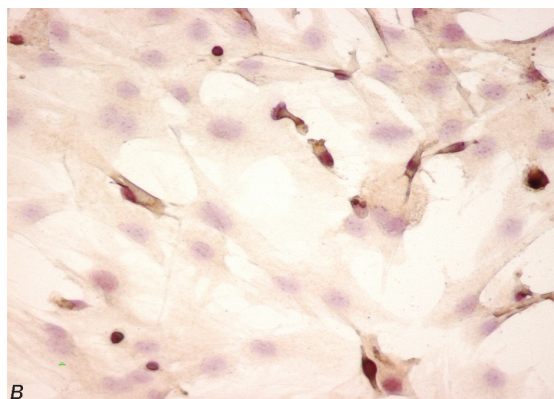
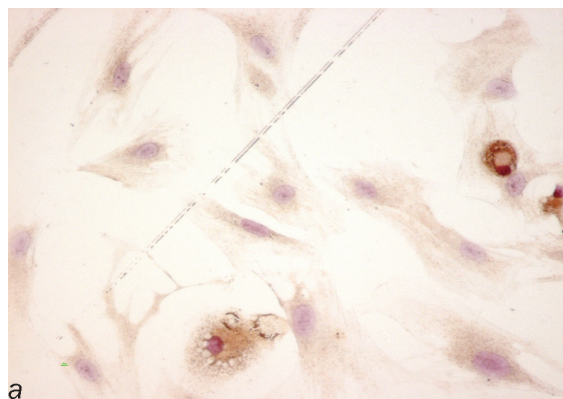


Рис. 1. Экспрессия маркера CD4 в культуре клеток тимуса эмбриона человека (иммуноцитохимическое исследование; $\times 200$).

Здесь и на рис. 2, 3: а – 1-я группа (контроль), б – 2-я группа (пептид АВ-0), в – 3-я группа (пептид R-1).

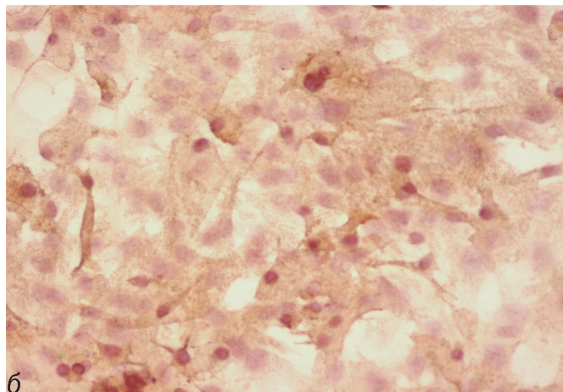
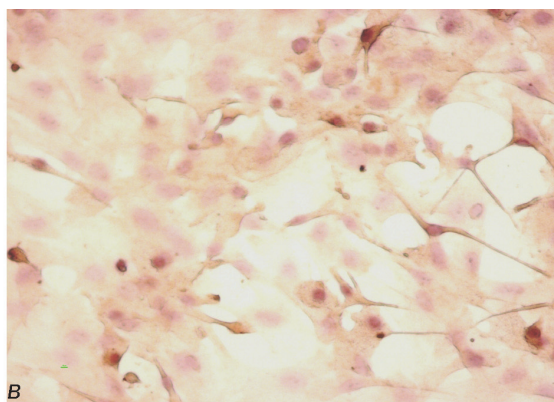
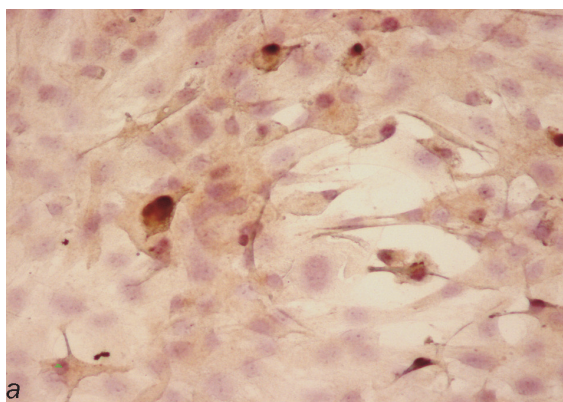


Рис. 2. Экспрессия маркера CD8 в культуре клеток тимуса эмбриона человека (иммуноцитохимическое исследование; $\times 200$).

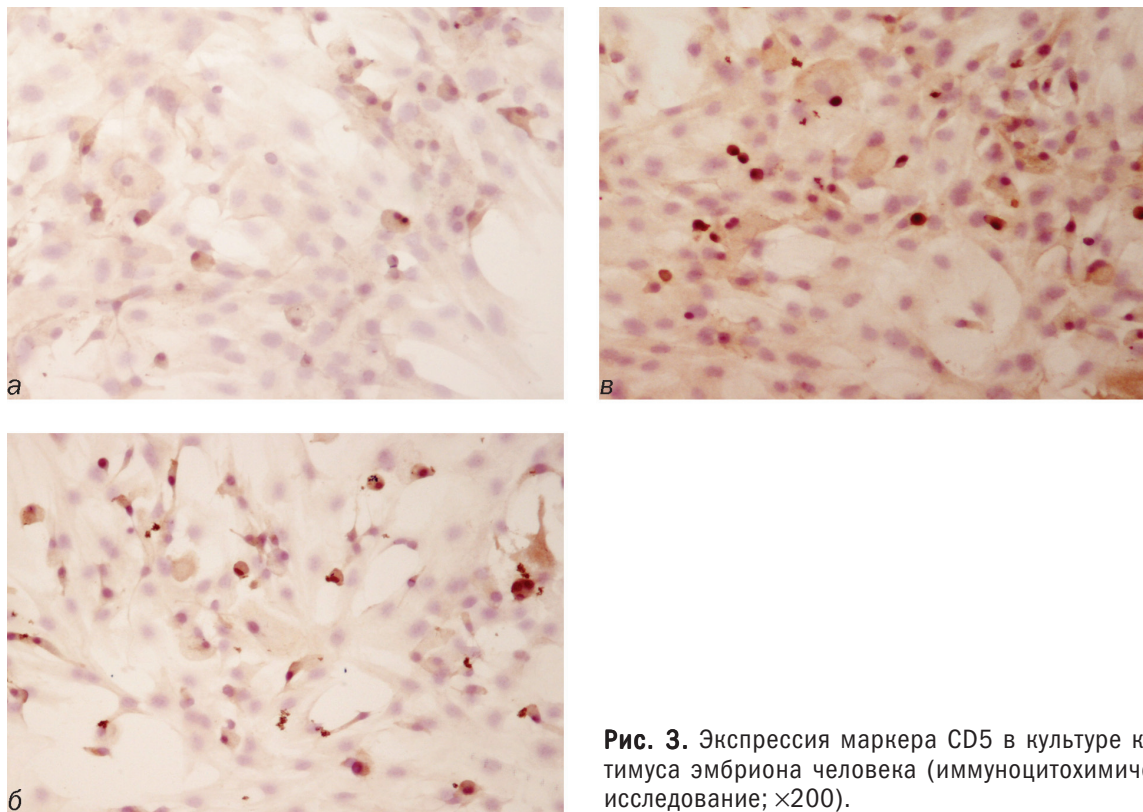


Рис. 3. Экспрессия маркера CD5 в культуре клеток тимуса эмбриона человека (иммуноцитохимическое исследование; $\times 200$).

CD4 и CD5, но не CD8. Таким образом, этот дипептид, по-видимому, стимулирует дифференцировку предшественников Т-клеток тимуса в направлении Т-хелперов, что подтверждает его клинические иммуностимулирующие и онкостатические эффекты у пациентов пожилого возраста [1,6]. Дипептид R-1 обладает теми же, только более выраженными эффектами, что и АВ-0. Кроме того, дипептид R-1 способствует индукции дифференцировки цитотоксических Т-лимфоцитов, о чем свидетельствует усиление экспрессии маркеров CD5 и CD8. Известно, что снижение численности субпопуляции CD8⁺-клеток является одной из причин развития аутоиммунных заболеваний, а синтетические дипептиды тимоген и тимодепрессин — эффективными средствами для лечения данной патологии [2]. Дальнейшее исследование иммунопротекторных свойств пептида R-1 позволит более полно охарактеризовать его в качестве вещества, способствующего восстановлению функций иммунной системы при иммунодефицитах и аутоиммунных заболеваниях.

Таким образом, дипептиды АВ-0 и R-1 обладают выраженными иммуномодулирующими свойствами в культурах клеток тимуса человека и крысы, стимулируют дифференцировку лим-

фоцитов, однако эффект дипептида АВ-0 направлен на Т-хелперы, тогда как дипептид R-1 стимулирует также и дифференцировку клеток-предшественников в направлении цитотоксических Т-лимфоцитов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Anisimov V.N., Khavinson V.Kh. // Biogerontology. 2010. Vol. 11. P. 139-149.
2. Deigin V.I., Poverenny A.M., Semina O.V., Semenets T.N. // Immunol. Lett. 1999. Vol. 67, N 1. P. 41-46.
3. Fedoreyeva L.I., Kireev I.I., Khavinson V.Kh., Vanyushin B.F. // Biochemistry (Mosc). 2011. Vol. 76, N. 11. P. 1505-1516.
4. Khavinson V.Kh., Linkova N.S., Trofimov A.V. et al. // Biol. Bulletin Rev. 2011. Vol. 1, N 4. P. 389-393.
5. Khavinson V.Kh., Malinin V.V. Gerontological aspects of genome peptide regulation. Basel (Switzerland), 2005.
6. Khavinson V.Kh., Morozov V. // Neuroendocrinol. Lett. 2003. Vol. 24, N 3-4. P. 233-240.
7. Khavinson V.Kh., Polyakova V.O., Linkova N.S. et al. // J. Amino Acids. 2011. Vol. 2011. P. 517137.
8. Lin'kova N.S., Polyakova V.O., Trofimov A.V. et al. // Bul. Exp. Biol. Med. 2011. Vol. 151, N 2. P. 239-242.
9. Patent US. № 6,139,862 USA. Pharmaceutical dipeptide compositions and methods of use thereof / Khavinson V.Kh., Sery S.V., Morozov V.G. // 31.10.2000.
10. Yarilin A.A., Belyakov I.M. // Curr. Med. Chem. 2004. Vol. 11, N 4. P. 447-464.

Получено 30.07.12