

# ВЛИЯНИЕ КОРОТКИХ ПЕПТИДОВ НА ЭКСПРЕССИЮ СИГНАЛЬНЫХ МОЛЕКУЛ В ОРГАНОТИПИЧЕСКОЙ КУЛЬТУРЕ КЛЕТОК ЭПИФИЗА

В.Х.Хавинсон, Н.С.Линькова, Н.И.Чалисова, А.В.Дудков, Е.А.Концевая

*Санкт-Петербургский институт биорегуляции и геронтологии СЗО РАМН*

Получены данные, свидетельствующие о влиянии коротких пептидов на экспрессию сигнальных молекул в органотипической культуре эпифиза 3-месячных крыс. Пептиды Ala-Glu-Asp-Gly и Lys-Glu-Asp усиливают экспрессию пролиферативного протеина Ki-67 в культуре клеток эпифиза. Эти пептиды, а также Glu-Asp-Arg и Lys-Glu, не влияют на экспрессию маркера апоптоза AIF. Только пептид Ala-Glu-Asp-Gly стимулирует синтез пинеалоцитами транскрипционного фактора CGRP. Таким образом, пептид Ala-Glu-Asp-Gly вызывает тканеспецифическую стимуляцию как пролиферативной, так и секреторной активности пинеалоцитов, что может являться одним из способов восстановления функций эпифиза на молекулярном уровне.

**Ключевые слова:** *органотипическая культура эпифиза, короткие пептиды, сигнальные молекулы*

Важнейшим звеном, координирующим активность нейроиммуноэндокринной системы, является эпифиз (пинеальная железа, шишковидное тело). Нарушение функциональной активности клеток эпифиза, пинеалоцитов, и, прежде всего, снижение секреции мелатонина и нейропептида CGRP, приводят к ускоренному старению организма [1,2,9]. Кроме того, снижение функциональной активности эпифиза, наблюдаемое у лиц старше 60 лет, приводит к развитию патологии нейроиммуноэндокринной системы, выражающейся в нарушении циркадианных ритмов организма, развитии нейродегенеративных заболеваний, в иммунодефицитных состояниях, усилении канцерогенеза, эндокринопатиях и сердечно-сосудистых заболеваниях [2,4,8]. Регуляторные пептиды, влияющие на процессы развития тканей, широко распространены в живых организмах и выделяются разными клетками и тканями как эндокринные и аутокринные носители информации о локальном состоянии органа или ткани. Поддержание биологической целостности организма на клеточном уровне регулируется сигналами, которые позволяют сохранять сложное равновесное состояние между двумя основными физиологическими процессами — пролиферацией и программируемой клеточной гибелью (апоптозом). Функцию медиаторных межклеточных сигналов на пара- и аутокринном уровнях выполняют секреторные белки — цитокины, а

также цитомедины — пептидные биорегуляторы, выделенные из тканей животных и поддерживающие структурный и функциональный гомеостаз клеточных популяций, которые содержат и продуцируют этот фактор [8,12]. В Санкт-Петербургском институте биорегуляции и геронтологии СЗО РАМН синтезированы короткие пептиды, являющиеся аналогами цитомединов и содержащие наиболее часто встречающиеся в соответствующих тканях аминокислоты [3,9,11,13].

Показана эффективность пептида Ala-Glu-Asp-Gly в восстановлении функций эпифиза, однако молекулярные механизмы его активности изучены недостаточно [3,11].

Целью работы явилось исследование влияния ряда коротких пептидов на синтез сигнальных молекул, отражающих процессы клеточного обновления и синтетическую способность пинеалоцитов в органотипической культуре эпифиза крыс.

## МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

Метод органотипического культивирования позволяет сохранить нормальные тканевые взаимодействия между субпопуляциями клеток. Это предоставляет возможность исследовать разные влияния на совокупность клеток шишковидной железы, что было бы невозможно в диссоциированной культуре пинеалоцитов [10].

В работе использовали 2-3-месячных самцов крыс Вистар, полученных из питомника "Рапполово". Животных декапитировали с использованием гильотины. Эпифиз, выделенный

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



у животных с помощью инструментов для глазной хирургии, помещали в стерильную чашку Петри и разделяли на эксплантаты (фрагменты около 1 мм<sup>3</sup>). 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 ( $n=50$ ) были разделены на 5 групп: контрольную (введение физиологического раствора) и четыре опытные, в каждой из которых применяли один из пептидов — АЕ-0 (Ala-Glu-Asp-Gly), Т-33 (Glu-Asp-Arg), Т-38 (Lys-Glu-Asp) и АВ-0 (Lys-Glu) в концентрации 10 нг/мл. Все эксплантаты культивировали в CO<sub>2</sub>-инкубаторе при 36.7°C в среде с 5% содержанием CO<sub>2</sub>. Продолжительность культивирования составила 3 сут (временной интервал, необходимый для формирования зоны роста, состоявшей из пролиферирующих и мигрирующих пинеалоцитов с примесью фибробластов, макрофагов) [8]. Эксплантаты эпифиза для проведения иммуноцитохимического исследования в зоне роста эксплантатов фиксировали 95% этиловым спиртом.

Имуноцитохимическую реакцию проводили с антителами к маркерам нейропептида, ассоциированного с геном кальцитонина CGRP (1:500, “Abcam”), пролиферативного протеина Ki-67 (1:60, “Novocastra”) и фактора митохондриального апоптоза AIF (1:500, “Abcam”) с использованием стандартного одноэтапного протокола с высокотемпературной демаскировкой антигена в цитратном буфере (pH 6.0). В качестве вторичных антител использовали универсальный набор, содержащий биотинилированные антимышинные 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 иммунопозитивными клетками, к общей площади клеток в поле зрения и выражали в процентах. Оптическую плотность экспрессии измеряли в условных единицах (усл. ед.). Площадь экспрессии характеризует количество клеток, на которых

экспрессируется исследуемый маркера, а оптическая плотность — количество маркерного белка, выделяемого одной клеткой.

Статистическая обработка данных включала расчет среднего значения, стандартного отклонения от среднего и доверительного интервала.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

При исследовании влияния коротких пептидов на экспрессию маркера пролиферации Ki-67 в органотипической культуре клеток эпифиза установлено, что площадь экспрессии Ki-67 достоверно увеличивается под воздействием пептидов Т-38 и АЕ-0 в 1.7 и 3 раза соответственно, тогда как пептиды АВ-0 и Т-33 не влияют на указанный показатель (рис. 1, а). При этом оптическая плотность экспрессии Ki-67 не изменялась при введении в культуральную среду пептидов АЕ-0, АВ-0, Т-38 и достоверно снижалась в 1.6 раза под влиянием пептида Т-33 (таблица). Таким образом, пептиды АЕ-0 и Т-38 усиливают пролиферативную активность клеток эпифиза молодых крыс. Ранее нами было показано, что у долгожителей пролиферативная активность пинеалоцитов резко снижается по сравнению с лицами пожилого возраста [7]. Это позволяет предположить, что пептид Т-38, и особенно АЕ-0, могут способствовать восстановлению пролиферативной активности клеток эпифиза, снижающейся при старении.

Поскольку процессы пролиферации и апоптоза тесно связаны между собой, нами проведено изучение показателей экспрессии маркера митохондриального апоптоза AIF. Выбор белка AIF, а не наиболее распространенного маркера каспазависимого апоптоза p53, обусловлен тем, что в предыдущих исследованиях эпифиза людей старше 60 лет было показано, что с возрастом экспрессия p53 не изменяется, тогда как процессы митохондриального апоптоза усиливаются [7]. Однако в органотипической культуре эпифиза ни один из исследуемых пептидов достоверно не влиял на площадь экспрессии и оптическую плотность AIF (рис. 1, б; таблица). Возможно, отсутствие изменения экспрессии белка AIF в культуре эпифиза крыс обусловлено тем, что материал был получен от молодых животных, у которых процессы митохондриального апоптоза находятся на физиологическом уровне и не повышаются, как это было отмечено при старении.

Нейропептид CGRP, ассоциированный с геном кальцитонина, является специфическим транскрипционным протеином, секретируемым тканями мозга, эпифиза и тимуса. Пептиды оказывали разнонаправленное действие на экспрессию CGRP. Пептид АЕ-0 способствовал уве-

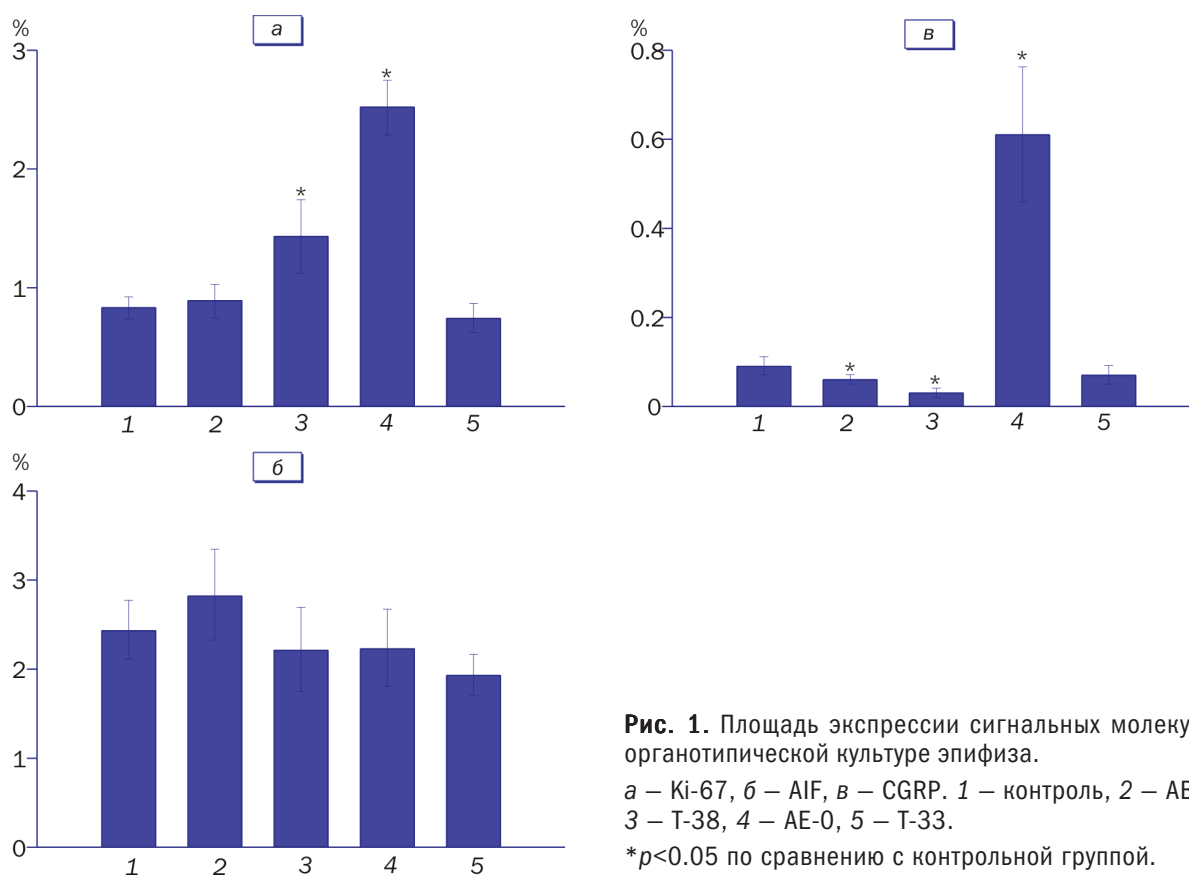


личению площади экспрессии CGRP в 6.8 раза по сравнению с контролем при одновременном снижении оптической плотности экспрессии CGRP в 1.8 раза (рис. 1, в; рис. 2; таблица). Таким образом, пептид АЕ-0 увеличивал число пинеалоцитов, экспрессирующих исследуемый транскрипционный фактор, и одновременно снижал интенсивность данного процесса в одной клетке. Пептид Т-38 подавлял экспрессию CGRP по показателю площади экспрессии в 3 раза и по показателю оптической плотности в 1.6 раза (рис. 1, в; таблица). Пептиды АВ-0 и Т-33 не оказывали влияния на экспрессию маркера CGRP в органотипической культуре эпифиза (рис. 1, в; таблица).

Полученные данные свидетельствуют о том, что пептид АЕ-0 стимулирует пролиферативную

активность клеток эпифиза и их способность секретировать транскрипционный протеин CGRP, являющийся регуляторным фактором, участвующим в нейроиммуноэндокринных взаимодействиях, тогда как пептиды Т-33 и АВ-0 такими эффектами не обладают. Пептид Т-38 усиливает пролиферацию клеток эпифиза, что дополняет полученные нами данные об усилении пролиферативной активности разных типов клеток под влиянием указанного трипептида [5]. Однако пептид Т-38 не влияет на экспрессию других белков в исследуемой культуре, в том числе на экспрессию CGRP.

Поскольку пептид АЕ-0 был синтезирован на основе анализа аминокислотного состава экстракта, выделенного из эпифиза животных [6],



**Рис. 1.** Площадь экспрессии сигнальных молекул в органотипической культуре эпифиза.

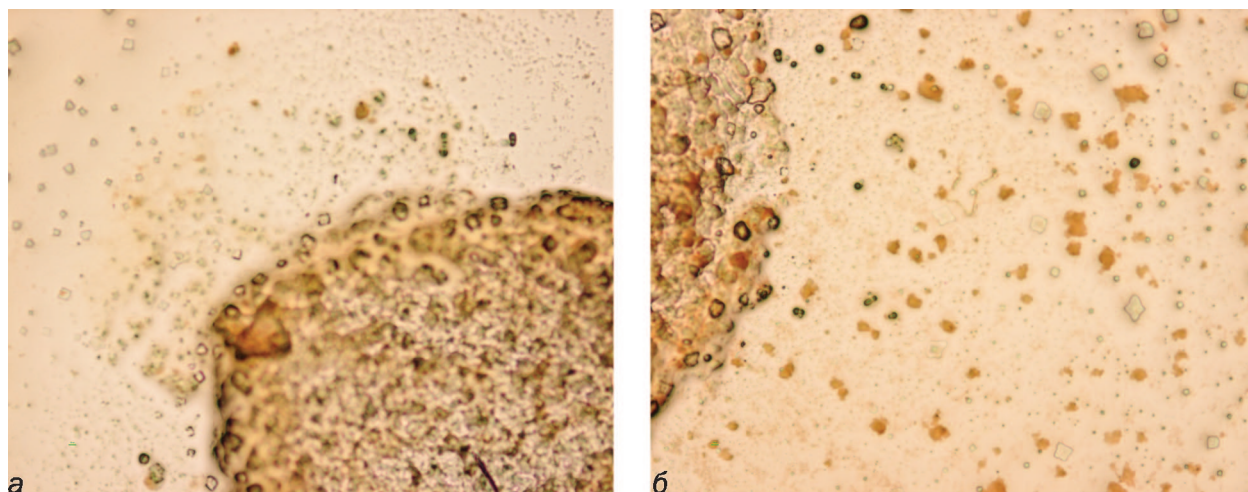
а – Ki-67, б – AIF, в – CGRP. 1 – контроль, 2 – АВ-0, 3 – Т-38, 4 – АЕ-0, 5 – Т-33.

\* $p < 0.05$  по сравнению с контрольной группой.

Средняя оптическая плотность экспрессии сигнальных молекул Ki-67, AIF, CGRP в органотипической культуре эпифиза (усл. ед.;  $M \pm m$ )

Группа	Ki-67	AIF	CGRP
Контроль	0.24±0.05	0.20±0.04	0.20±0.03
АВ-0	0.17±0.03	0.23±0.05	0.28±0.08
Т-38	0.15±0.04	0.21±0.04	0.12±0.03*
АЕ-0	0.21±0.06	0.16±0.03	0.11±0.02*
Т-33	0.15±0.02*	0.19±0.03	0.15±0.04

**Примечание.** \* $p < 0.05$  по сравнению с контрольной группой.



**Рис. 2.** Экспрессия нейропептида CGRP в органотипической культуре эпифиза: данные иммуноцитохимии ( $\times 100$ ). а – контроль, б – при введении пептида АЕ-0 в концентрации 10 нг/мл. Сплошное коричневое окрашивание – зона экплантата, диффузные коричневые фрагменты вокруг зоны экплантата – экспрессия исследуемого маркера в монослое клеток эпифиза.

его стимулирующее воздействие на экспрессию сигнальных молекул пинеалоцитов свидетельствует о тканеспецифическом действии указанного тетрапептида, которое показано на молекулярном уровне.

Представляется вероятным, что в основе стимуляции пептидом АЕ-0 экспрессии фактора транскрипции CGRP лежит механизм связывания указанного тетрапептида с геном белка CGRP, т.к. ранее была показана возможность взаимодействия пептида АЕ-0 с разными генами [12,13].

В результате проведенного исследования установлено, что тетрапептид АЕ-0 оказывает тканеспецифическую стимуляцию пролиферативной и секреторной активности клеток эпифиза крыс в органотипической культуре, что может являться одним из молекулярных механизмов восстановления функциональной активности эпифиза, снижающейся при старении.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Гончарова Н.Д., Хавинсон В.Х., Лапин Б.А. Пинеальная железа и возрастная патология (механизмы и коррекция). СПб., 2007.

2. Иванов С.В. // Успехи геронтол. 2007. Т. 20, № 2. С. 60-69.
3. Коркушко О.В., Хавинсон В.Х., Шатило В.Б. Пинеальная железа: пути коррекции при старении. СПб., 2006.
4. Линькова Н.С., Полякова В.О., Трофимов А.В. и др. // Бюл. exper. биол. 2011. Т. 151, № 2. С. 203-206.
5. Линькова Н.С., Полякова В.О., Трофимов А.В. и др. // Успехи геронтол. 2010. Т. 23, № 4. С. 543-546.
6. Линькова Н.С., Трофимов А.В., Полякова В.О. и др. // Успехи геронтол. 2011. Т. 24, № 1. С. 38-42.
7. Полякова В.О., Линькова Н.С., Пичугин С.А. // Бюл. exper. биол. 2010. Т. 150, № 10. С. 443-445.
8. Хавинсон В.Х., Голубев А.Г. // Успехи геронтол. 2002. Вып. 9. С. 67-73.
9. Хавинсон В.Х., Яковлева Н.Д., Попучиев В.В. и др. // Бюл. exper. биол. 2001. Т. 131, № 1. С. 98-101.
10. Чалисова Н. И., Князькин И. В., Кветной И. М. Нейро-иммуноэндокринные механизмы действия пептидов и аминокислот в тканевых культурах. СПб., 2005.
11. Anisimov V.N., Khavinson V.Kh. // Biogerontology. 2010. Vol. 11, N 2. P. 139-149.
12. Khavinson V., Goncharova N., Lapin B. // Neuroendocrinol. Lett. 2001. Vol. 22, N 4. P. 251-255.
13. Khavinson V.Kh., Malinin V.V. Gerontological aspects of genome peptide regulation. Basel (Switzerland), 2005.

Получено 06.04.11