

На правах рукописи

ЧЕРВЯКОВА

Наталья Александровна

**ПЕПТИДЕРГИЧЕСКАЯ РЕГУЛЯЦИЯ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ
ЛИМФОИДНЫХ КЛЕТОК СЕЛЕЗЕНКИ
У ЖИВОТНЫХ РАЗЛИЧНОГО ВОЗРАСТА**

14.01.30 – геронтология и гериатрия

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Санкт-Петербург – 2017

Работа выполнена в лаборатории молекулярных механизмов старения АНО НИЦ «Санкт-Петербургский институт биорегуляции и геронтологии»

Научный руководитель:

доктор биологических наук

Линькова Наталья Сергеевна

Официальные оппоненты:

Виноградова Ирина Анатольевна, доктор медицинских наук, профессор, ВГБОУ ВПО «Петрозаводский государственный университет», кафедра фармакологии, организации и экономики фармации медицинского института, заведующая кафедрой;

Назаров Петр Григорьевич, доктор медицинских наук, профессор, ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», руководитель отдела иммунологии.

Ведущая организация:

ФГБВОУ ВО «Военно-медицинская академия имени С.М. Кирова» МО РФ

Защита диссертации состоится « » _____ 2017 г. в _____ часов на заседании Диссертационного Совета Д 521.103.01 в АНО НИЦ «Санкт-Петербургский институт биорегуляции и геронтологии» по адресу: 197119, Санкт-Петербург, пр. Динамо, 3.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте АНО НИЦ «Санкт-Петербургский институт биорегуляции и геронтологии» <http://www.gerontology.ru>.

Автореферат разослан « » _____ 2017 г.

Ученый секретарь
диссертационного Совета,
доктор биологических наук, профессор



Козина Людмила Семеновна

Введение

Актуальность работы

Известно, что у людей пожилого и старческого возраста значительно повышается вероятность развития инфекционных заболеваний. В первую очередь это связано со снижением функциональной активности иммунной системы, обусловленной инволютивными процессами в органах иммуногенеза [Назаров П.Г. и др., 2013; Виноградова И.А. и др., 2014].

В старении иммунной системы важную роль играет гетерогенная инволюция тимуса. Атрофия тимуса начинается довольно рано, и существуют предположение, что при старении часть функций тимуса делегируется селезенке [Полякова В.О. и др., 2010]. При этом инволютивные изменения в самой селезенке изучены недостаточно.

Иммунная функция селезенки заключается в утилизации макрофагами вредных веществ и очищении крови от чужеродных агентов. В селезенке разрушаются нерастворимые компоненты клеточного детрита – эндотоксины. Лимфоидные клетки белой пульпы селезенки человека способны синтезировать специфические антитела в ответ на поступление в кровь чужеродных антигенов [Schneider D.A. et al., 2011].

В пожилом возрасте наблюдается снижение функциональной активности селезенки. Помимо морфо-функциональных признаков старения селезенки как органа было показано изменение числа лимфоидных клеток в ней при старении [Bronte V., Pittet M.J., 2013].

Важную роль в механизмах старения селезенки, подобно другим органам иммунной системы, играет пептидная регуляция [Цыган В.Н., 2014]. В работе В.Х. Хавинсона и соавторов были изучены геропротекторные свойства пептидов в отношении культур клеток селезенки при ускоренном старении [Хавинсон В.Х. и др., 2010]. Таким образом, пептидные биорегуляторы играют важную роль в поддержании функциональной активности селезенки. Приведенные данные свидетельствуют о возможности повышения функциональной активности селезенки и замедлении её старения под действием пептидных биорегуляторов.

В основе молекулярного механизма действия пептидов лежит их способность эпигенетически регулировать экспрессию ряда специфичных генов и синтез соответствующих белков, ответственных за апоптоз, пролиферацию и дифференцировку клеток. В данном исследовании приводятся новые аспекты молекулярных механизмов действия аминокислот и пептидов в отношении культур клеток селезенки крыс при старении, а также предложена модель взаимодействия пептида с молекулой ДНК, объясняющая его биологическую активность.

Цель и задачи исследования

Целью диссертационного исследования явилось сравнительное изучение влияния аминокислот Lys, Glu и пептидов Lys-Glu, Glu-Asp-Arg, Ala-Glu-Asp-Gly, Glu-Trp на экспрессию сигнальных молекул в культуре клеток селезенки при старении.

Для достижения указанной цели были поставлены следующие задачи:

1. Изучить влияние аминокислот Lys, Glu, пептидов Lys-Glu, Glu-Asp-Arg, Ala-Glu-Asp-Gly, Glu-Trp на экспрессию маркера предшественников Т- и В-лимфоцитов CD5 в диссоциированных и органотипических культурах клеток селезенки крыс при старении.

2. Изучить влияние аминокислот Lys, Glu, пептидов Lys-Glu, Glu-Asp-Arg, Ala-Glu-Asp-Gly, Glu-Trp на экспрессию маркеров В-лимфоцитов, находящихся на разных ступенях дифференцировки (CD19, CD20, CD23), а также маркера межклеточных взаимодействий CD40 в диссоциированных и органотипических культурах клеток селезенки крыс при старении.
3. Изучить влияние аминокислот Lys, Glu, пептидов Lys-Glu, Glu-Asp-Arg, Ala-Glu-Asp-Gly, Glu-Trp на экспрессию маркера макрофагов CD68 в диссоциированных и органотипических культурах клеток селезенки крыс при старении.
4. Создать молекулярную модель предполагаемого взаимодействия аминокислот Lys, Glu, пептида Lys-Glu с промоторными участками генов, кодирующих белки - маркеры иммунных клеток.
5. Выяснить молекулярные механизмы тканеспецифического действия пептида Lys-Glu в отношении культур клеток селезенки крыс при старении.

Научная новизна

Впервые проведено сравнительное изучение влияния аминокислот Lys и Glu, а так же пептидов Lys-Glu, Glu-Asp-Arg, Ala-Glu-Asp-Gly и Glu-Trp в органотипических и диссоциированных культурах клеток селезенки крыс при старении.

Установлено, что пептиды Lys-Glu и Glu-Trp стимулируют дифференцировку В-клеток селезенки, о чем свидетельствует снижение уровня экспрессии маркера ранних предшественников Т- и В-лимфоцитов, CD5, в диссоциированных культурах клеток селезенки крыс при старении. Кроме того, пептиды Lys-Glu и Glu-Trp повышают уровень экспрессии маркера В-лимфоцитов конечной стадии дифференцировки CD19 в органотипических и диссоциированных культурах клеток селезенки крыс при старении. Впервые показано, что пептиды Lys-Glu, Glu-Trp, Ala-Glu-Asp-Gly индуцируют экспрессию маркера зрелых активированных В-лимфоцитов CD20 в органотипических и диссоциированных культурах клеток селезенки крыс при их старении. Эти данные впервые позволили обосновать молекулярные аспекты пептидной стимуляции дифференцировки и повышения функциональной активности В-лимфоцитов в селезенке при ее старении. Впервые показано, что среди изученных пептидов только Lys-Glu, помимо активации В-клеточного звена иммунитета способен активировать пролиферацию тканевых макрофагов, что выражается в увеличении экспрессии маркера CD68 в культурах клеток селезенки при старении.

Установлено, что аминокислоты Lys, Glu и пептид Lys-Glu способны комплементарно связываться с последовательностью ДНК 5'АТАТА3', которая повторяет ТАТА-бокс в промоторном участке генов белков, участвующих в иммуногенезе в селезенке. При этом впервые показано, что для пептида Lys-Glu такое взаимодействие более вероятно, чем для аминокислот, т.к. энергия образования комплекса ДНК-пептид ниже, чем энергии комплексов ДНК-аминокислота.

Практическая значимость

Установлено, что пептид Lys-Glu по сравнению с аминокислотами Lys и Glu, имеет большее сродство к ТАТА-боксу промоторной зоны генов белков, участвующих в иммуногенезе селезенки. Эти данные указывают на эффективность применения Lys-Glu для стимуляции пролиферативной активности клеток селезенки крыс при старении. Использованная в работе методология исследования

позволила провести сравнительный анализ молекулярных механизмов биологической активности аминокислот Lys, Glu и пептидов Lys-Glu, Glu-Asp-Arg, Ala-Glu-Asp-Gly и Glu-Trp в органотипических и диссоциированных культурах клеток селезенки крыс при старении. Эта же методология может применяться для исследования биологической активности других геропротекторных и иммунопротекторных веществ. Важным практическим результатом работы является положение о том, что пептиды Lys-Glu и Glu-Trp способны эффективно стимулировать сниженную с возрастом функциональную активность клеток селезенки, повышая экспрессию маркеров В-лимфоцитов и макрофагов.

Положения, выносимые на защиту

1. Пептиды Lys-Glu и Glu-Trp снижают уровень экспрессии кластера дифференцировки В- и Т-клеток в диссоциированных культурах клеток селезенки крыс при старении.
2. Пептиды Lys-Glu и Glu-Trp стимулируют сниженную с возрастом функциональную активность клеток селезенки за счет повышения уровня экспрессии В-лимфоцитов, находящихся на различных стадиях дифференцировки в органотипических и диссоциированных культурах клеток селезенки при старении. При этом эффект пептида Lys-Glu более выражен в сравнении с пептидом Glu-Trp.
3. Пептид Lys-Glu может эпигенетически регулировать экспрессию генов, продукты которых обеспечивают процессы клеточного обновления в культурах клеток селезенки, за счет комплиментарного связывания с последовательностью 5'АТАТАЗ', которая повторяет последовательность ТАТА-бокса в промоторных участках генов.
4. Пептид Lys-Glu стимулирует экспрессию маркера макрофагов CD68 в органотипических и диссоциированных культурах клеток селезенки крыс при старении.
5. Пептид Lys-Glu обладает более выраженным иммунопротекторным действием в отношении культур клеток селезенки крыс при старении в сравнении с пептидами Glu-Asp-Arg, Ala-Glu-Asp-Gly, Glu-Trp и аминокислотами Lys, Glu.

Связь с научно-исследовательской работой института

Диссертационная работа является научной темой, выполняемой по основному плану НИР Санкт-Петербургского института биорегуляции и геронтологии.

Публикации по теме диссертации

По материалам диссертации опубликовано 20 научных работ, в том числе 4 статьи в журналах, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ для опубликования материалов диссертационных исследований, 1 статья в сборнике и 15 тезисов докладов.

Апробация и реализация диссертации

Основные материалы диссертации доложены на Пушкинских чтениях (Санкт-Петербург, 2012); Всероссийской молодежной конференции с международным участием «Фундаментальные аспекты старения. Хрупкость: модели, маркеры, фенотипы. Результаты проекта «Хрусталь» (Санкт-Петербург, 2013); IV International symposium interactions of the nervous and immune systems in health and

disease (Санкт-Петербург, 2013); VI Российском симпозиуме «Белки и пептиды»; Научно-практической конференции и школе, посвященной памяти академика В.В. Фролькиса «Актуальные проблемы геронтологии и гериатрии: от теории к практике» (Санкт-Петербург, 2013); Конгрессе «Человек и лекарство» (Москва, 2013); Международном форуме «Старшее поколение» (Санкт-Петербург, 2013); Научной конференции молодых ученых с международным участием «Актуальные проблемы геронтологии и гериатрии» (Санкт-Петербург, 2013); 8th European Congress of Biogerontology joint with the 2nd international Resolve Meeting “Healthy Ageing and Regenerative Medicine” (Израиль, 2013); 20th IAGG World Congress of Gerontology and Geriatrics (Seoul, Korea, 2013).

Личный вклад автора

Личный вклад автора в диссертационное исследование состоял в разработке плана исследования, проведении опытов, статистической обработке и анализе данных молекулярного моделирования. В задачи автора входило проведение сравнительного анализа молекулярного механизма действия аминокислот Lys, Glu, а так же пептидов Lys-Glu, Glu-Asp-Arg, Ala-Glu-Asp-Gly, Glu-Trp в отношении культур клеток селезенки при старении. В ходе выполнения исследования автором освоена методика диссоциированного и органотипического культивирования клеток и метод иммуноцитохимического исследования. Автор принимал участие во всех экспериментах, включавших в себя культивирование клеток, иммуноцитохимическое окрашивание, микроскопию, морфометрию, молекулярное моделирование взаимодействия аминокислот Lys, Glu и пептида Lys-Glu с ДНК и статистический анализ данных.

Структура и объем диссертации

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания результатов собственных исследований, выводов, практических рекомендаций и указателя литературы. Текст диссертации изложен на 126 страницах, содержит 2 таблицы, иллюстрирован 19 рисунками. Список литературы содержит 178 источников, из них на русском языке – 39, на английском – 139.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Характеристика исследуемого материала

Объектом для морфо-функционального исследования была выбрана селезенка молодых (3 мес.) и старых (24 мес.) крыс линии Wistar. Крысы были получены в виварии Института физиологии им. И.П. Павлова РАН (Санкт-Петербург, Россия). Работа выполнена на 50 самцах крыс массой 220-380 г. Животных содержали в условиях вивария при комнатной температуре с 12-часовым циклом свет/темнота, свободным доступом к воде и пище, на стандартной диете в соответствии с нормами содержания лабораторных животных.

Для исследования влияния пептидов на селезенку крыс использовали органотипические и диссоциированные культуры. Органотипические культуры молодых крыс (200 эксплантов) и старых крыс (200 эксплантов) разделили на 7 групп: 1 группа – контроль, 2 группа – добавление аминокислоты Lys, 3 группа – добавление аминокислоты Glu, 4 группа – добавление пептида Lys-Glu, 5 группа – добавление пептида Ala-Glu-Asp-Gly, 6 группа – добавление пептида Glu-Trp, 7

группа – добавление пептида Glu-Asp-Arg. Концентрация аминокислот и пептидов составила 1 нг/мл.

Диссоциированные «молодые» (3 пассаж, 60 культур) и «старые» (23 пассаж, 45 культур) культуры клеток селезенки разделили на 7 групп: 1 группа – контроль, 2 группа – добавление аминокислоты Lys, 3 группа – добавление аминокислоты Glu, 4 группа – добавление пептида Lys-Glu, 5 группа – добавление пептида Ala-Glu-Asp-Gly, 6 группа – добавление пептида Glu-Trp, 7 группа – добавление пептида Glu-Asp-Arg. Концентрация аминокислот и пептидов составила 100 нг/мл. Различные концентрации пептидов и аминокислот для диссоциированных и органотипических культур клеток были выбраны на основании результатов ранее проведенных исследований, в которых было показано, что эффективная концентрация этих веществ зависит от типа культуры [Khavinson V. Kh. et al., 2012; 2014].

Характеристика аминокислот и пептидов, добавляемых в культуры

В работе были использовали пептиды Lys-Glu (KE, вилон), Glu-Trp (EW, тимоген), Ala-Glu-Asp-Gly (AEDG, эпталон) и Glu-Asp-Arg (EDR, пинеалон) в виде стерильного раствора, расфасованного в ампулы в концентрации 100 мкг в 1 мл. Кроме того, в исследовании применяли аминокислоты Lys (К, лизин), Glu (Е, глутаминовая кислота) фирмы Sigma в виде сухого порошка, который разводили физиологическим раствором до нужной концентрации. Для опытов аминокислоты и пептиды для введения в органотипические и диссоциированные культуры клеток разводили соответственно до концентраций 1 нг/мл и 100 нг/мл.

Тимоген является фармакопейным препаратом – иммуномодулятором, оказывающим влияние на реакции клеточного, гуморального иммунитета и неспецифическую резистентность организма. Стимулирует процессы регенерации в случае их угнетения, улучшает течение процессов клеточного метаболизма. Усиливает процессы дифференцировки лимфоидных Т-клеток, обладает способностью стимулировать колониеобразующую активность клеток костного мозга, индуцирует экспрессию дифференцировочных рецепторов на лимфоцитах, нормализует количество Т-хелперов, Т-супрессоров и их соотношение у больных с различными иммунодефицитными состояниями [Яковлев Г.М. и др., 1990].

Вилон обладает тимомиметическим и иммуномодулирующим действием. Результаты клинических испытаний вилонна, проведенных на больных туберкулезом, хроническим гепатитом и другими заболеваниями, свидетельствуют о перспективности изучения данного пептида в качестве препарата, обладающего репаративными и общерегуляторными свойствами, оказывающего влияние на клеточный и гуморальный иммунитет, неспецифическую резистентность организма, процессы антиоксидантной защиты и регенерацию тканей. Кроме того, вилон регулирует экспрессию генов интерлейкинов и других молекул, синтезируемых лимфоидными клетками [Хавинсон В.Х. и др., 1999].

Эпталон является регулятором функций эпифиза – центрального органа нейроиммуноэндокринной системы. Этот пептид обладает выраженными геропротекторными эффектами: способствует преодолению лимита Хейфлика, увеличению продолжительности жизни животных, увеличению длины теломер и активации теломеразы в лимфоцитах крови человека. Эпталон регулирует функцию репродуктивной системы, обладает нейропротекторным и ретинопротекторным действием, является онкостатиком и способствует

восстановлению функций тимуса при его ускоренном старении [Хавинсон В.Х., 2000].

Пинеалон – нейротропный пептид, не оказывающий влияния на иммунную систему и выбранный нами в качестве отрицательного контроля. [Хавинсон В.Х. и др., 2007].

Глутаминовая кислота (2-аминопентандиовая кислота) - алифатическая дикарбоновая аминокислота. Глутаминовая кислота играет важную роль в азотистом обмене, является нейромедиаторной аминокислотой. Глутаминовая кислота относится к группе заменимых аминокислот, ее содержание в организме составляет до 25% от всех аминокислот.

Лизин (2,6-диаминогексановая кислота) — алифатическая аминокислота с выраженными свойствами основания. Лизин - незаменимая аминокислота, входящая в состав практически любых белков, необходима для роста, восстановления тканей, производства антител, гормонов, ферментов, альбуминов. Эта аминокислота оказывает противовирусное действие, особенно в отношении вирусов, вызывающих герпес и острые респираторные инфекции. Исследования, проведенные на животных, показали, что недостаток лизина вызывает иммунодефицитные состояния.

Культивирование клеток

Органотипическое культивирование ткани селезенки молодых и старых крыс проводили по описанной ранее методике [Khavinson V.Kh. et al., 2012]. Затем проводилось окрашивание эксплантатов методом иммуноцитохимии.

Среда для диссоциированных культур клеток селезенки крыс содержала 15% фетальной бычьей сыворотки, 82,5% DMEM, 1,5% NEPEs и L-глутамин. Материалом для выделения первичной культуры клеток служила селезенка, полученная от молодых крыс линии Wistar. Выделение первичной культуры проводили на чашках Петри обработанных раствором желатина (Биолот), последующее культивирование осуществляли во флаконах с обработанной поверхностью объемом 50 мл (JetBiofil, 25 см² поставщик Биолот). Клетки выращивали в 5 мл культуральной среды на флакон площадью 25 см² и в 3 мл культуральной среды на чашку Петри диаметром 3.5 см. Через 5-7 дней первичная культура достигала монослоя, и ее пересеивали с использованием раствора трипсина-версена в соотношении 1:3 (Биолот). При каждом пересеве производили добавление раствора с аминокислотами и пептидами в ростовую среду в концентрации 100 нг/мл. Пассирование производили через 3 дня на четвертый, когда культура достигала состояния монослоя. Культивирование проводили до 3 и 23 пассажей, на которых клетки были рассеяны на планшеты. Клетки выращивали до 3 пассажа («молодая» культура) и до 23 пассажа («старая» культура) в соответствии с рекомендацией Международной ассоциации исследований клеточных культур (США, Сан-Франциско, 2007).

Иммуноцитохимическое исследование

Для иммуноцитохимического исследования использовали первичные и вторичные антитела. В качестве первичных антител применялись моноклональные мышиные анти-человеческие антитела к маркерам CD5 (1:75, Dako), CD19 (1:50, Novocastra), CD20 (1:100, Dako), CD23(1:100, Dako), CD40 (1:100, Dako), CD68 (1:30, Abcam), Иммуноцитохимическое окрашивание органотипических и диссоциированных культур селезенки крыс и морфометрию проводили по ранее

описанной методике [Khavinson V.Kh. et al. 2012]. В качестве вторых антител использовали универсальный набор, содержащий биотинилированные анти-мышинные иммуноглобулины (Novocastra). Визуализацию иммуноцитохимической реакции проводили с применением комплекса авидина с биотинилированной пероксидазой (ABC-kit), с последующим проявлением пероксидазы хрена диаминобензидином (Novocastra).

Указанные маркеры иммунных клеток были выбраны нами в связи с их высокой информативностью в отношении иммунной функции селезенки. CD5 является лимфоцитарным рецептором, присутствующих на Т- и В-клетках в промежуточной стадии дифференцировки. CD19 присутствует на В-лимфоцитах с самых ранних этапов развития линии и теряется на этапе их созревания в плазматические клетки. Мутации в CD19 связаны с тяжелыми иммунодефицитными синдромами, характеризующиеся сниженной выработкой антител. CD20 является иммуноцитохимическим маркером, который применяют для верификации зрелых В-клеток. Молекула CD20 принимает участие в В-клеточной пролиферации. CD20 начинает синтезироваться на ранних стадиях дифференцировки В-клеток, а именно в пре-В-клетках до появления тяжёлых цепей иммуноглобулинов в цитоплазме. Этот маркер исчезает только при финальной дифференцировке В-клетки в плазматическую клетку. CD23 - низкоаффинный рецептор IgE, существует в двух формах и присутствует на зрелых В-лимфоцитах человека, необходим для их роста и активации. Молекула CD40 реализует взаимодействия между В- и Т-лимфоцитами, в некоторых случаях может экспрессироваться на макрофагах и дендритных клетках. Макросиалин (CD68) является гликозилированным трансмембранным протеином, участвующим в движении лизосом, в основном экспрессируется на макрофагах.

Метод молекулярного моделирования

Молекулярное моделирование комплексов участков ДНК с аминокислотами лизином (Lys), глутаминовой кислотой (Glu) и пептидом вилонем (Lys-Glu) выполняли с использованием программного обеспечения Molecular Operating Environment 2012, где были визуализированы химические структуры аминокислот Lys, Glu, вилонем и участков ДНК, и были рассчитаны с помощью молекулярного докинга их наиболее энергетически выгодные комплексы.

Аминокислоты и пептид вилонем строили в левовращающей конформации. В качестве двухцепочечной ДНК выбирали дуплексы В-формы 5'AAAAA3', 5'CCCCC3', 5'ATATA3', 5'CGCGC3', 5'ATGCA3', 5'GCAGC3', 5'TGTGT3'. После построения молекулы протонировали в условиях pH 7.0, T = 310 K и 0.15 M NaCl. Затем проводили оптимизацию геометрии молекул в полноатомном силовом поле Amber12EHT, параметризованном специально для белков и нуклеиновых кислот.

В докинге использовали силовое поле Amber 12EHT и генетический алгоритм поиска GBVI/WSA. Генетический алгоритм представляет собой оптимизационную схему, имитирующую процесс эволюции, который позволяет эффективно исследовать все доступное для лиганда пространство. После построения молекул ДНК и лиганда протонировали при pH 7 и T=300 K. Энергию взаимодействия пептида и аминокислот с ДНК определяли величиной оценочной функции S [ккал/моль], которую рассчитывали по формуле:

$$S \approx c + \alpha \left[\frac{2}{3} (\Delta E_{coul} + \Delta E_{sol}) + \Delta E_{vdw} + \beta \Delta SA_{weighted} \right],$$

где c - значение потери ротационной и трансляционной энтропии комплекса; α , β - экспериментально определенные константы, которые зависят от силового поля; E_{coul} - значение кулоновской энергии, которая рассчитывается с использованием заряда системы при диэлектрической константе равной 1; E_{sol} - значение электростатической энергии растворителя; E_{vdw} - Ван-дер-Ваальсовый вклад в энергию взаимодействия; $SA_{weighted}$ - вклад молекулярных оболочек в значение энергии.

Решения докинга ранжировали по убыванию от наиболее энергетически выгодного решения до наименее энергетически выгодного решения. Из каждого решения докинга (n=10) анализировали только первые решения, так как они являются наиболее энергетически выгодными.

Статистическая обработка результатов

Статистическая обработка экспериментальных данных включала в себя подсчет среднего арифметического, стандартного отклонения и доверительного интервала для каждой выборки и проводилась в программе Statistica 6.0. Для анализа вида распределения использовали критерий Шапиро-Уилка (Shapiro-Wilk's W-test). Для проверки статистической однородности нескольких выборок были использованы непараметрические процедуры однофакторного дисперсионного анализа (критерий Крускала-Уоллиса). В случаях, когда дисперсионный анализ выявлял статистически значимую неоднородность нескольких выборок, для последующего выявления неоднородных групп (путем их попарных сравнений) применяли процедуры множественных сравнений с помощью U-критерия Манна-Уитни. Критический уровень достоверности нулевой гипотезы (об отсутствии различий) принимали равным 0,05.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Экспрессия маркера предшественников В- и Т-лимфоцитов (CD5) в культурах клеток селезенки при их старении

В «молодых» диссоциированных культурах клеток селезенки уровень экспрессии CD5 в контрольной группе составил $3,76 \pm 0,19\%$. В «старых» культурах клеток площадь экспрессии данного маркера в контрольной группе снижалась до $2,12 \pm 0,21\%$. Под действием пептида Ala-Glu-Asp-Gly уровень экспрессии исследуемого маркера в «молодых» культурах повышался в 1,94 раза до $4,56 \pm 0,25\%$. При этом, в «старых» культурах данный пептид не оказывал влияния на экспрессию CD5. Пептиды Lys-Glu и Glu-Trp, напротив, понижали уровень экспрессии исследуемого маркера В-лимфоцитов в «молодых» культурах в 3,8 раза и в 2 раза до $0,97 \pm 0,07\%$ и $1,87 \pm 0,22\%$ соответственно, а в «старых» культурах в 3,78 и в 1,9 раза до $0,56 \pm 0,14\%$ и $1,12 \pm 0,20\%$ соответственно (рисунок 1).

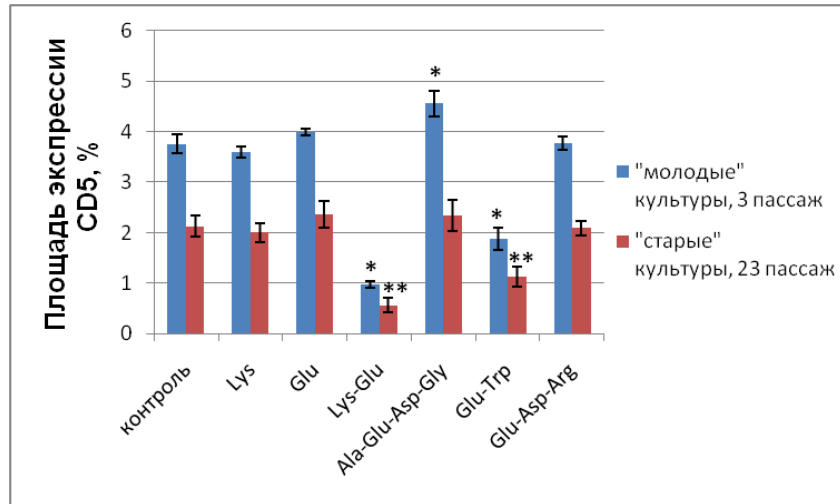


Рисунок 1. Влияние аминокислот и пептидов на экспрессию маркера предшественников В-лимфоцитов в диссоциированных культурах клеток селезенки крыс. Здесь и на рисунках 2-12: * $p < 0,05$ по сравнению с контрольной группой в "молодых" культурах клеток; ** - $p < 0,05$ по сравнению с контрольной группой в "старых" культурах клеток.

При исследовании влияния аминокислот и пептидов на экспрессию маркера CD5 в органотипических культурах клеток селезенки крыс было обнаружено, что пептид Ala-Glu-Asp-Gly усиливал экспрессию данного маркера в органотипических культурах селезенки молодых животных, в то время, как аминокислота Glu понижала экспрессию CD5 в органотипических культурах селезенки старых животных, а пептид Lys-Glu снижал уровень экспрессии этого белка в органотипических культурах селезенки молодых крыс (рисунок 2).

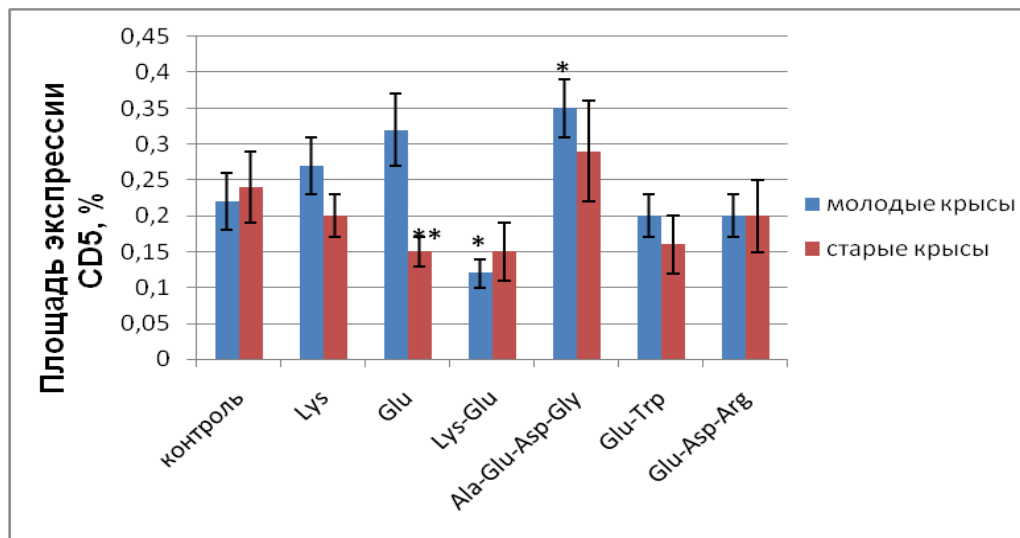


Рисунок 2. Влияние аминокислот и пептидов на экспрессию маркера предшественников В-лимфоцитов в органотипических культурах клеток селезенки молодых и старых крыс.

Площадь экспрессии CD5 в контрольной группе культур, полученных от молодых животных составила $0,22 \pm 0,04\%$, в органотипических культурах селезенки старых крыс контрольной группы экспрессия CD5 незначительно повышалась до $0,24 \pm 0,05\%$. Под действием пептида Ala-Glu-Asp-Gly площадь экспрессии исследуемого маркера

в органотипических культурах селезенки молодых животных повышалась в 1,6 раза до $0,35 \pm 0,04\%$. Под действием аминокислоты Glu уровень экспрессии CD5 в органотипических культурах селезенки старых крыс понижался на 60% и составил $0,15 \pm 0,02\%$. Под действием пептида Lys-Glu площадь экспрессии CD5 снижалась на 83% в органотипических культурах селезенки молодых животных и составила $0,12 \pm 0,02\%$ (рисунок 2).

Полученные данные показали, что пептид Lys-Glu в диссоциированных и органотипических культурах селезенки при их старении снижает экспрессию маркера предшественника Т- и В-клеток CD5. Этот эффект может быть связан со стимуляцией дифференцировки лимфоидных клеток в направлении зрелых В-клеток. Таким же эффектом, однако, только в органотипических культурах селезенки старых крыс, обладала глутаминовая кислота. Обратным эффектом в диссоциированных и органотипических культурах селезенки обладал пептид Ala-Glu-Asp-Gly. Тетрапептид повышал экспрессию маркера CD5. С одной стороны, это может указывать на способность пептида Ala-Glu-Asp-Gly стимулировать пролиферацию CD5⁺ клеток-предшественников лимфоцитов, а с другой – стимулировать дифференцировку стволовых клеток в направлении предшественников лимфоцитов. Таким образом, из всех изученных веществ только пептид Lys-Glu может способствовать дифференцировке В-клеток и повышать иммунную функцию селезенки при ее старении.

Экспрессия маркера ранних зрелых В-лимфоцитов (CD19) в культурах клеток селезенки при их старении

В «молодых» диссоциированных культурах клеток селезенки уровень экспрессии CD19 составил $5,98 \pm 0,24\%$. При старении наблюдалось заметное снижение площади экспрессии данного маркера, его уровень в «старых» культурах клеток понижался в 5 раз и составил $1,19 \pm 0,10\%$. Аминокислоты лизин и глутаминовая кислота – не оказывали влияния на уровень экспрессии исследуемого маркера в «молодых» и «старых» культурах клеток селезенки. В «молодых» культурах клеток пептид Glu-Asp-Arg вызывал уменьшение площади экспрессии на 20% до $4,80 \pm 0,42\%$. При этом пептиды Lys-Glu, Ala-Glu-Asp-Gly и Glu-Trp достоверно повышали уровень экспрессии исследуемого маркера. Так, пептид Lys-Glu оказывал наиболее существенное влияние: площадь экспрессии CD19 при воздействии пептида в «молодых» культурах клеток увеличивалась в 1,5 раза и составила $9,11 \pm 1,03\%$, а в «старых» культурах клеток площадь экспрессии CD19 увеличивалась в 5,3 раза и составила $6,33 \pm 0,32\%$. Таким образом, пептид Lys-Glu у старых животных восстанавливал уровень экспрессии CD19 до контрольного значения молодых животных. Пептиды Ala-Glu-Asp-Gly и Glu-Trp так же повышали уровень экспрессии CD19 в «молодых» культурах и «старых» культурах клеток селезенки. Под действием пептида Ala-Glu-Asp-Gly площадь экспрессии в «молодых» культурах увеличивалась на 15% до $6,99 \pm 0,35\%$, а в «старых» культурах в 2,3 раза до $2,76 \pm 0,19\%$. Пептид Glu-Trp так же повышал уровень экспрессии CD19 в «молодых» культурах на 23% до $7,76 \pm 0,31\%$, а в «старых» культурах в 4,3 раза до $5,13 \pm 0,41\%$ (рисунок 3).

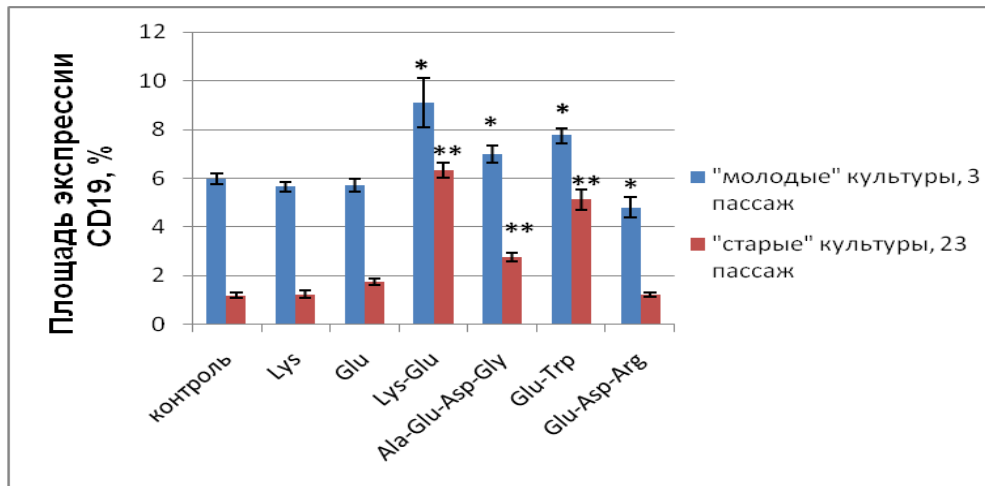


Рисунок 3. Влияние аминокислот и пептидов на экспрессию маркера ранних зрелых В-лимфоцитов в диссоциированных культурах клеток селезенки молодых и старых крыс.

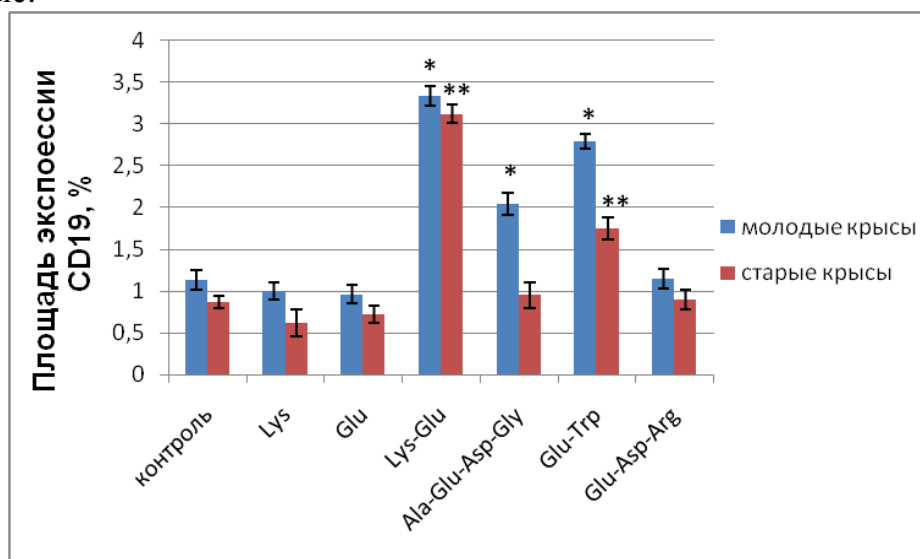


Рисунок 4. Влияние аминокислот и пептидов на экспрессию маркера ранних зрелых В-лимфоцитов в органотипических культурах клеток селезенки молодых и старых крыс.

Площадь экспрессии CD19 в контрольной группе в органотипических культурах от молодых животных - составила $1,13 \pm 0,12\%$, в органотипических культурах от старых животных контрольной группы экспрессия CD19 понижалась на 24% до $0,87 \pm 0,08\%$. Аминокислоты лизин и глутаминовая кислота, а так же пептид Glu-Asp-Arg не оказывали влияния на уровень экспрессии исследуемого маркера в органотипических культурах селезенки молодых и старых крыс. Пептид Ala-Glu-Asp-Gly повышал площадь экспрессии CD19 только в органотипических культурах селезенки молодых крыс на 45% до $2,05 \pm 0,13\%$. Пептид Glu-Trp увеличивал уровень экспрессии CD19 в органотипических культурах селезенки молодых животных в 2,4 раза до $2,79 \pm 0,09\%$, а у старых животных - в 2 раза до $1,75 \pm 0,13\%$. Пептид Lys-Glu оказывал наиболее сильное влияние на площадь экспрессии исследуемого маркера. В органотипических культурах селезенки молодых животных уровень экспрессии CD19 повышался в 3 раза до $3,34 \pm 0,12\%$, а органотипических культурах селезенки старых крыс - в 3,5 раза до $3,12 \pm 0,11\%$. Таким образом, пептиды Lys-Glu и Glu-Trp восстанавливали уровень экспрессии

CD19 в органотипических культурах селезенки старых животных до значения контрольных показателей культур, полученных от молодых крыс (рисунок 4).

Полученные данные показали, что пептиды Lys-Glu, Glu-Trp, Ala-Glu-Asp-Gly в диссоциированных и органотипических культурах селезенки при их старении стимулируют экспрессию маркера ранних зрелых В-лимфоцитов, CD19. При этом наибольший стимулирующий эффект показан для пептида Lys-Glu. Вероятно, это связано со способностью этого дипептида активировать дифференцировку В-клеток на различных этапах иммуногенеза, например, на стадии CD5⁺ клеток.

Экспрессия маркера зрелых В-лимфоцитов (CD20) в культурах клеток селезенки при их старении

В «молодых» диссоциированных культурах клеток селезенки уровень экспрессии CD20 составил $5,37 \pm 0,31\%$. При старении наблюдалось снижение площади экспрессии данного маркера, уровень его экспрессии в «старых» культурах клеток снижался в 3,6 раза и составил $1,47 \pm 0,13\%$. Аминокислоты лизин и глутаминовая кислота не оказывали влияния на уровень экспрессии исследуемого маркера в «молодых» культурах клеток селезенки. В «старых» культурах клеток аминокислота лизин не оказывала влияния на площадь экспрессии CD20, в то время как глутаминовая кислота вызывала достоверное повышение уровня экспрессии CD20 на 34%.

При исследовании влияния пептидов на площадь экспрессии маркера CD20 было обнаружено, что пептид Glu-Asp-Arg не оказывал влияния на уровень экспрессии CD20 в «молодых» и «старых» культурах клеток селезенки (рисунок 5).

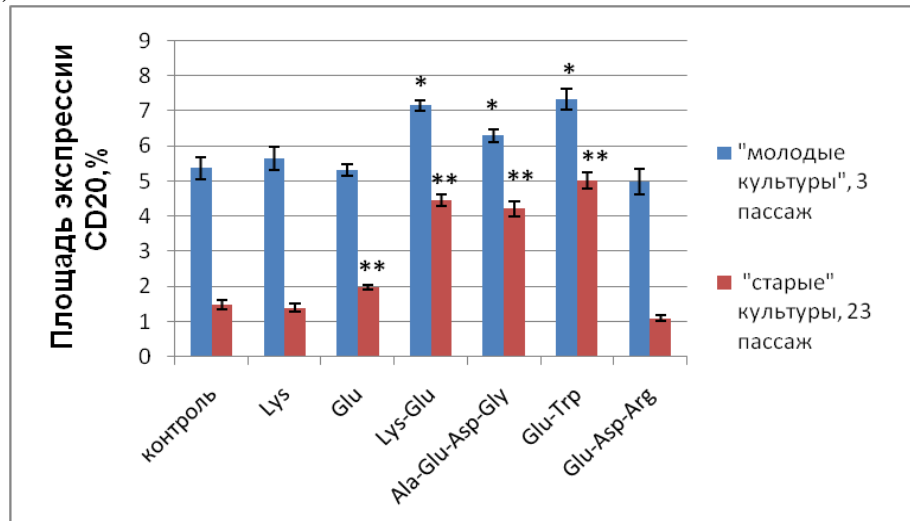


Рисунок 5. Влияние аминокислот и пептидов на экспрессию маркера зрелых В-лимфоцитов в диссоциированных культурах клеток селезенки крыс при старении.

Показано, что при этом пептиды Lys-Glu, Ala-Glu-Asp-Gly и Glu-Trp достоверно повышали уровень экспрессии исследуемого маркера. Так, пептид Glu-Trp оказывал наиболее существенное влияние: площадь экспрессии CD20 при воздействии пептида Glu-Trp в «молодых» культурах клеток увеличивалась на 36% и составила $7,32 \pm 0,30\%$, а в «старых» культурах клеток площадь экспрессии CD20 увеличивалась в 3,4 раза и составила $5,01 \pm 0,23\%$. Пептиды Lys-Glu и Ala-Glu-Asp-

Gly так же повышали уровень экспрессии CD20 в «молодых» культурах на 32% и 17%, значения площади экспрессии для пептидов Lys-Glu и Ala-Glu-Asp-Gly в «молодых» культурах клеток селезенки составили $7,15 \pm 0,15\%$ и $6,29 \pm 0,17\%$ соответственно. В «старых» культурах клеток селезенки уровень экспрессии CD20 так же достоверно повышался под действием пептидов Lys-Glu и Ala-Glu-Asp-Gly соответственно в 3,0 и 2,8 раза и составил $4,46 \pm 0,16\%$ и $4,21 \pm 0,22\%$ (рисунок 5).

При исследовании влияния аминокислот и пептидов на экспрессию маркера CD20 в органотипических культурах клеток селезенки крыс было обнаружено, что только пептиды Lys-Glu, Ala-Glu-Asp-Gly и Glu-Trp усиливали экспрессию данного маркера, при этом пептид Lys-Glu оказывал наиболее сильное влияние. Площадь экспрессии CD20 в контрольной группе культур, полученных от молодых животных составила $1,24 \pm 0,09\%$, а в культурах, полученных от старых животных контрольной группы экспрессия CD20 снижалась в 2,5 раза и составила $0,49 \pm 0,05\%$. Под действием пептида Lys-Glu уровень экспрессии CD20 в органотипических культурах, полученных от молодых крыс увеличивался в 2,5 раза, а в культурах селезенки старых животных - в 2,3 раза по сравнению с контролем и составил $3,17 \pm 0,10\%$ и $1,13 \pm 0,06\%$ соответственно (рисунок 6).

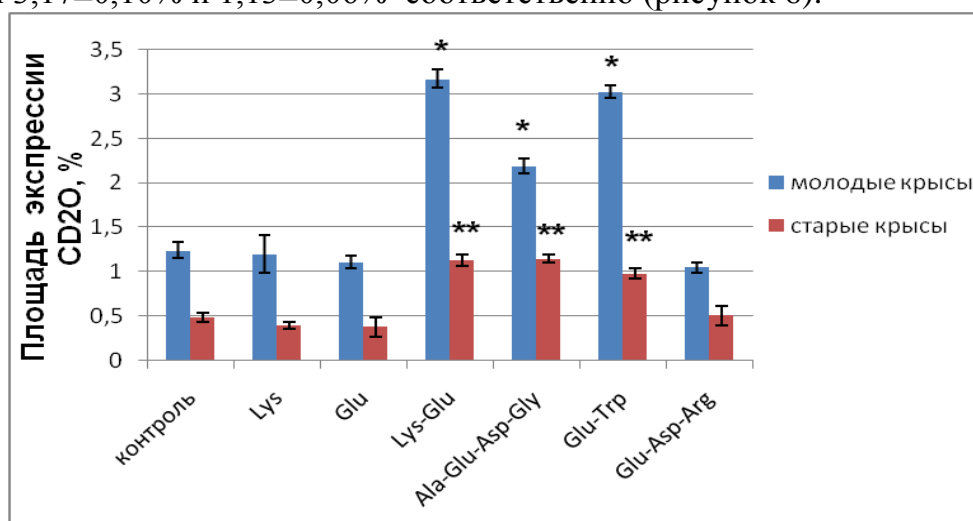


Рисунок 6. Влияние аминокислот и пептидов на экспрессию маркера зрелых В-лимфоцитов в органотипических культурах клеток селезенки молодых и старых крыс.

Под действием пептидов Ala-Glu-Asp-Gly и Glu-Trp площадь экспрессии CD20 так же достоверно повышалась в органотипических культурах селезенки молодых и старых животных. При действии пептида Ala-Glu-Asp-Gly уровень экспрессии CD20 в органотипических культурах молодых крыс увеличивался в 1,7 раза и составил $2,19 \pm 0,08\%$, в культурах селезенки, полученных от старых животных площадь экспрессии исследуемого маркера составила $1,15 \pm 0,05\%$, что соответствовало увеличению в 2,3 раза. Под действием пептида Glu-Trp уровень экспрессии CD20 так же достоверно повышался: в культурах от молодых животных - в 2,4 раза, от старых животных - в 2,0 раза по сравнению с контролем и составил $3,02 \pm 0,07\%$ и $0,98 \pm 0,06\%$ соответственно.

Полученные данные показали, что пептиды Lys-Glu, Glu-Trp, Ala-Glu-Asp-Gly в диссоциированных и органотипических культурах селезенки при их старении стимулируют экспрессию маркера зрелых покоящихся В-лимфоцитов, CD20. Таким же эффектом в «старых» диссоциированных культурах обладает глутаминовая кислота. Поскольку выраженность стимулирующего эффекта в

отношении маркера CD20 для всех трех иммуномодулирующих пептидов одинакова, можно предположить, что полученный эффект связан со способностью пептидов активировать пролиферацию этой субпопуляции лимфоидных клеток.

Экспрессия маркера активированных В-лимфоцитов (CD23) в культурах клеток селезенки при их старении

При изучении влияния аминокислот и пептидов на площадь экспрессии маркера В-лимфоцитов CD23 в диссоциированных культурах клеток было обнаружено, что аминокислота Glu снижала уровень экспрессии исследуемого маркера в «молодых» культурах клеток селезенки крыс, в то время как пептиды Ala-Glu-Asp-Gly, Glu-Trp и Lys-Glu повышали уровень экспрессии CD23, а аминокислота Lys и пептид Glu-Asp-Arg не влияли на площадь экспрессии этого маркера.

В контрольной группе «молодых» культур уровень экспрессии маркера В-лимфоцитов составила $2,76 \pm 0,20\%$. При старении наблюдалось снижение уровня экспрессии в 4,3 раза, до $0,63 \pm 0,09\%$ в контрольной группе «старых» культур. Под действием аминокислоты Glu в «молодых» культурах наблюдалось снижение уровня экспрессии на 58% до значения $1,62 \pm 0,23\%$. Под действием пептида Lys-Glu выявлено увеличение площади экспрессии CD23 в «молодых» и в «старых» культурах на 1,72 и 3,2 до $4,76 \pm 0,12\%$ и $2,00 \pm 0,12\%$ соответственно (рисунок 7). Под действием пептида Glu-Trp наблюдалось повышение интенсивности экспрессии исследуемого маркера в «молодых» культурах на 72% до $3,79 \pm 0,10\%$ и в «старых» культурах - в 2,5 раза до $1,59 \pm 0,09\%$. Пептид Ala-Glu-Asp-Gly повышал уровень экспрессии CD23 только в «молодых» культурах клеток на 74% до $3,75 \pm 0,16\%$.

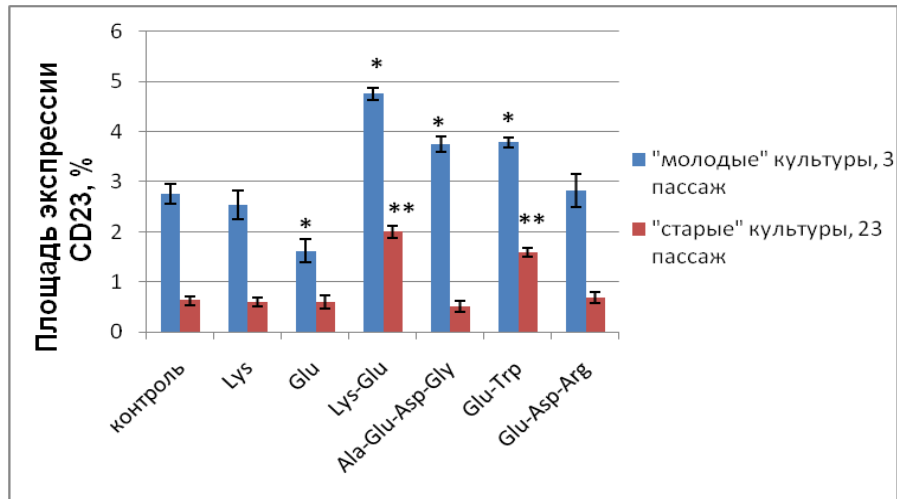


Рисунок 7. Влияние аминокислот и пептидов на экспрессию маркера активированных В-лимфоцитов в диссоциированных культурах клеток селезенки крыс.

При изучении влияния аминокислот и пептидов на уровень экспрессии маркера В-лимфоцитов CD23 было обнаружено, что пептиды Lys-Glu и Glu-Trp повышают уровень экспрессии исследуемого маркера только в органотипических культурах селезенки молодых животных, в то время, как аминокислота Lys и пептид Glu-Asp-Arg понижали уровень экспрессии этого маркера в органотипических культурах селезенки старых и молодых крыс соответственно. Аминокислота Glu и пептид Ala-Glu-Asp-Gly не влияли на площадь экспрессии

CD23 в органотипических культурах селезенки молодых и старых крыс. Пептид Lys-Glu оказывал наиболее сильное влияние на интенсивность экспрессии исследуемого маркера в органотипических культурах селезенки молодых животных, увеличивая его в 3,8 раза до $2,14 \pm 0,15\%$. Пептид Glu-Trp так же увеличивал площадь экспрессии в 2,3 раза до $1,27 \pm 0,13\%$. Пептид Glu-Asp-Arg понижал уровень экспрессии CD23 в органотипических культурах селезенки молодых животных на 39% до $0,34 \pm 0,09\%$. Аминокислота Lys снижала уровень экспрессии CD23 в органотипических культурах селезенки старых животных в 2,1 раза до $0,10 \pm 0,03\%$ (рисунок 8).

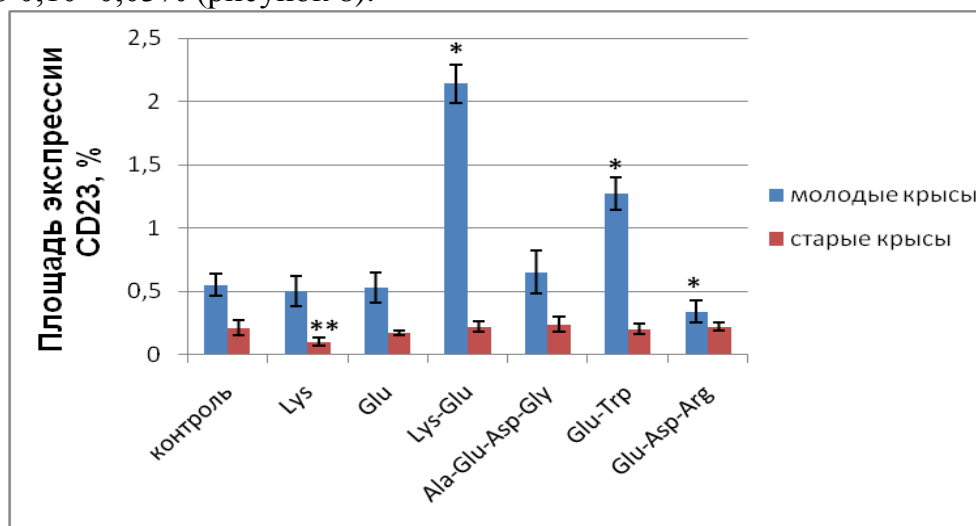


Рисунок 8. Влияние аминокислот и пептидов на экспрессию маркера активированных В-лимфоцитов в органотипических культурах клеток селезенки молодых и старых крыс.

Таким образом, пептиды Lys-Glu, Glu-Trp, Ala-Glu-Asp-Gly в диссоциированных и органотипических культурах селезенки при их старении стимулируют экспрессию маркера зрелых активированных В-лимфоцитов, CD23. Таким же, но менее выраженным эффектом, органотипических культурах селезенки старых крыс обладает пептид Glu-Asp-Arg, а обратным эффектом – лизин. Максимальная выраженность стимулирующего эффекта в отношении маркера CD23 показана для пептида Lys-Glu, что указывает на его способность участвовать в активации, а учитывая данные по влиянию на экспрессию маркеров CD5, CD19, CD20, также в пролиферации и дифференцировки В-клеток.

Экспрессия маркера межклеточных взаимодействий В-лимфоцитов (CD40) в культурах клеток селезенки при их старении

В «молодых» диссоциированных культурах клеток селезенки уровень экспрессии CD40 в контрольной группе составил $5,59 \pm 0,26\%$. У «старых» культур площадь экспрессии данного маркера в контрольной группе снижалась в 2,4 раза до $2,33 \pm 0,196\%$. Аминокислоты Lys и Glu не оказывали влияния на уровень экспрессии исследуемого маркера в «молодых» культурах клеток селезенки. В «старых» культурах клеток аминокислота Lys не оказывала влияния на площадь экспрессии CD40, в то время как аминокислота Glu вызывала повышение уровня экспрессии CD40 на 26% до $2,94 \pm 0,08\%$.

При исследовании влияния пептидов на уровень экспрессии маркера CD40 было обнаружено, что пептид Glu-Asp-Arg не оказывал влияния на уровень

экспрессии CD40 в «молодых» и «старых» культурах клеток селезенки. При этом пептиды Lys-Glu, Ala-Glu-Asp-Gly и Glu-Trp достоверно повышали уровень экспрессии исследуемого маркера в «молодых» и в «старых» культурах (рисунок 9).

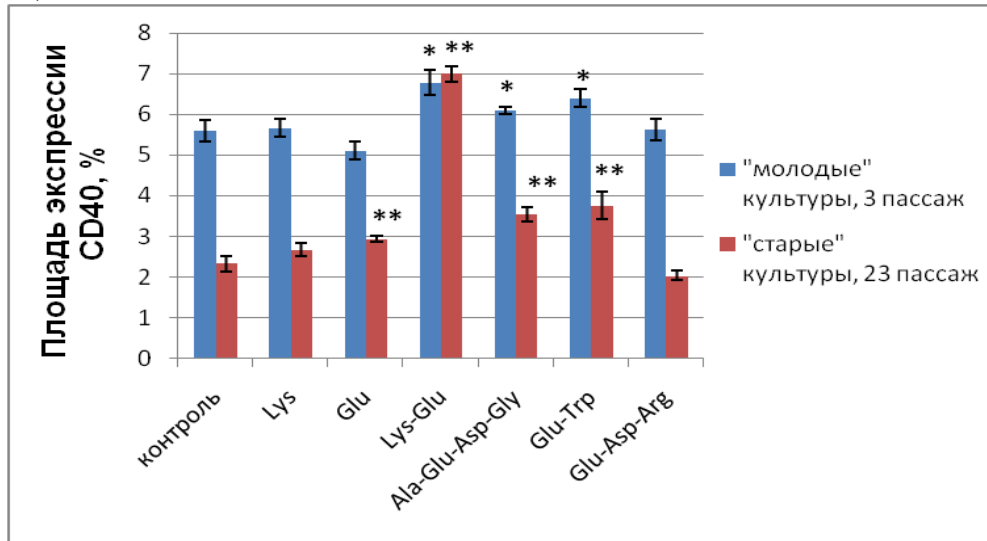


Рисунок 9. Влияние аминокислот и пептидов на экспрессию маркера межклеточных взаимодействий В-лимфоцитов в диссоциированных культурах клеток селезенки крыс при старении.

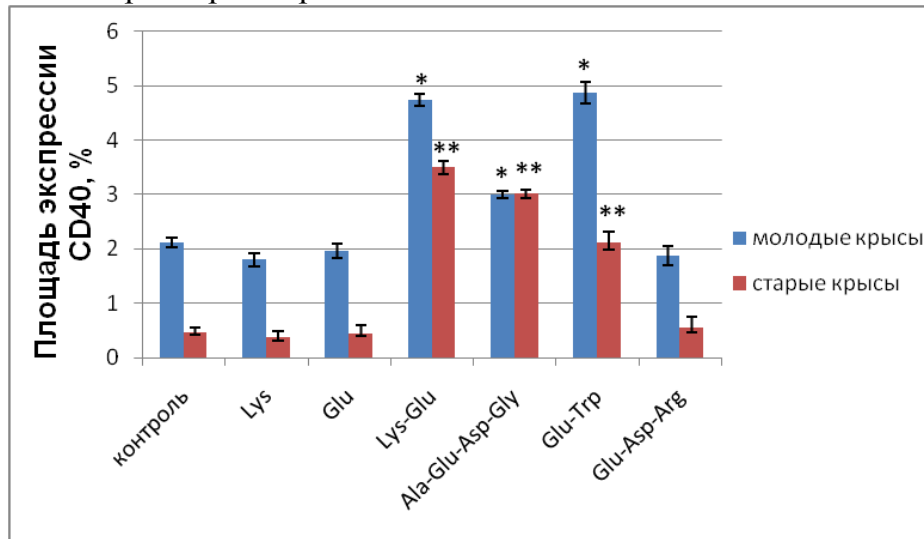


Рисунок 10. Влияние аминокислот и пептидов на экспрессию маркера межклеточных взаимодействий В-лимфоцитов в органотипических культурах клеток селезенки молодых и старых крыс.

Под действием пептидов Ala-Glu-Asp-Gly и Glu-Trp в «молодых» культурах клеток наблюдалось повышение площади экспрессии CD40 на 9% и 14% по сравнению с контролем, ее значение составило $6,09 \pm 0,09\%$ и $6,40 \pm 0,22\%$ соответственно. В «старых» культурах под действием пептидов Ala-Glu-Asp-Gly и Glu-Trp наблюдалось значительное повышение уровня экспрессии исследуемого маркера В-лимфоцитов на 51% и 61% до $3,54 \pm 0,17\%$ и $3,76 \pm 0,35\%$ соответственно.

Пептид Lys-Glu оказывал наиболее сильное влияние на уровень экспрессии маркера CD40. В «молодых» культурах площадь экспрессии данного маркера под действием пептида Lys-Glu повышалась на 21% и составила $6,78 \pm 0,31\%$.

В «старых» культурах клеток селезенки под действием пептида наблюдалось увеличение уровня экспрессии CD40 в 3 раза до $6,99 \pm 0,20\%$, что соответствует уровню экспрессии CD40 у «молодых» культур.

При исследовании влияния аминокислот и пептидов на экспрессию маркера CD40 в органотипических культурах клеток селезенки крыс было обнаружено, что только пептиды Lys-Glu, Ala-Glu-Asp-Gly и Glu-Trp усиливали экспрессию данного маркера.

Площадь экспрессии CD40 в контрольной группе в органотипических культурах селезенки молодых животных составила $2,12 \pm 0,09\%$, в органотипических культурах селезенки старых крыс контрольной группы экспрессия CD40 снижалась в 4,5 раза и составила $0,47 \pm 0,06\%$. Под действием пептида Lys-Glu уровень экспрессии CD40 в органотипических культурах селезенки молодых животных увеличивался в 2,2 раза, а в культурах, полученных от старых животных - в 7,5 раза по сравнению с контролем, и составил $4,74 \pm 0,11\%$ и $3,51 \pm 0,13\%$ соответственно.

Под действием пептидов Ala-Glu-Asp-Gly и Glu-Trp площадь экспрессии CD40 так же достоверно повышалась в органотипических культурах селезенки молодых и старых животных. При действии пептида Ala-Glu-Asp-Gly уровень экспрессии CD40 в органотипических культурах селезенки молодых крыс увеличивался в 1,4 раза и составил $2,99 \pm 0,07\%$, в органотипических культурах селезенки старых животных площадь экспрессии исследуемого маркера составила $3,02 \pm 0,10$, что соответствовало увеличению в 6,4 раза. Под действием пептида Glu-Trp уровень экспрессии CD40 так же достоверно повышался: в органотипических культурах селезенки молодых животных - в 2,3 раза, в органотипических культурах селезенки старых крыс - в 4,5 раза по сравнению с контролем и составил $4,87 \pm 0,20\%$ и $2,12 \pm 0,13\%$ соответственно.

Полученные данные показали, что пептиды Lys-Glu, Glu-Trp, Ala-Glu-Asp-Gly в диссоциированных и органотипических культурах селезенки при их старении стимулируют экспрессию маркера межклеточных взаимодействий В-лимфоцитов, CD40. Таким же эффектом в «старых» диссоциированных культурах обладает глутаминовая кислота. Наибольшей стимулирующей активностью в диссоциированных культурах клеток обладает пептид Lys-Glu, тогда как в органотипических культурах эффект больше заметен для пептида Glu-Trp. Такое различие может быть связано с тем, что в органотипических культурах пептид Glu-Trp может влиять на микроокружение В-лимфоцитов. При этом пептид Lys-Glu, вероятно, воздействует не столько на клетки микроокружения в селезенке, сколько непосредственно на В-лимфоциты.

Экспрессия маркера макрофагов (CD68) в культурах клеток селезенки при их старении

При изучении влияния аминокислот и пептидов на площадь экспрессии маркера макрофагов CD68 в диссоциированных культурах клеток было обнаружено, что только пептид Lys-Glu повышал уровень экспрессии исследуемого маркера в «молодых» и в «старых» культурах клеток селезенки крыс. Так, в контрольной группе «молодых» культур клеток селезенки площадь экспрессии CD68 составила $0,09 \pm 0,02\%$, в «старых» культурах площадь экспрессии составила $0,12 \pm 0,03\%$. Под действием пептида Lys-Glu в «молодых» культурах площадь экспрессии повышалась на 58% до $1,38 \pm 0,06\%$, в «старых» культурах площадь экспрессии увеличивалась почти в 2 раза до $1,57 \pm 0,04\%$ (рисунок 11).

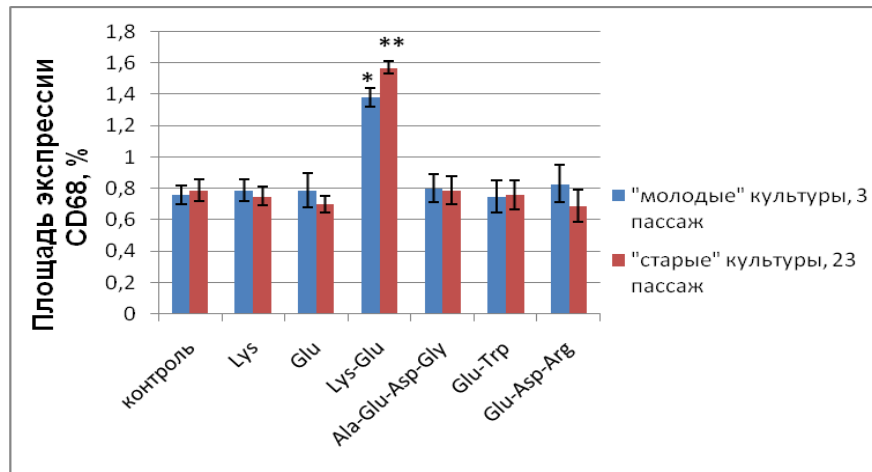


Рисунок 11. Влияние аминокислот и пептидов на экспрессию маркера макрофагов в диссоциированных культурах клеток селезенки молодых и старых крыс.

При исследовании влияния аминокислот и пептидов на площадь экспрессии маркера макрофагов CD68 в органотипических культурах клеток селезенки было обнаружено, что из всех исследуемых веществ только пептид Lys-Glu достоверно увеличивал уровень экспрессии исследуемого маркера. В контрольных органотипических культурах селезенки старых крыс площадь экспрессии CD68 составила $0,12 \pm 0,03\%$, под действием дипептида уровень экспрессии увеличивался на 63% до $0,19 \pm 0,03\%$ (рисунок 12).

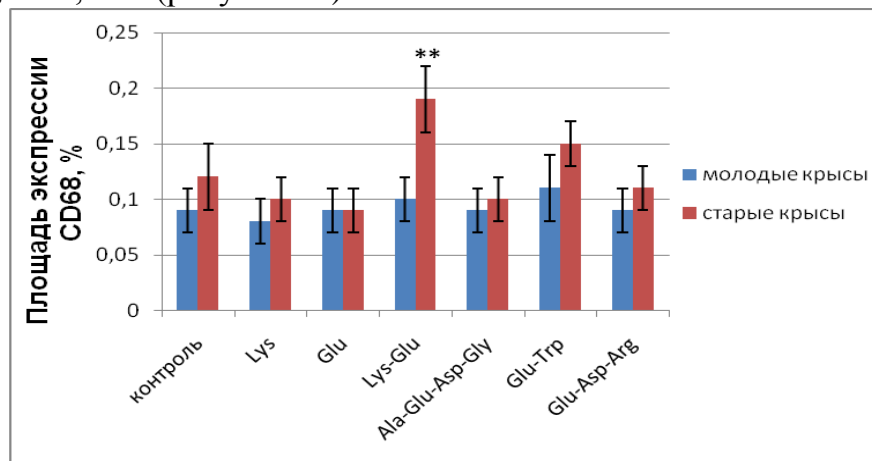


Рисунок 12. Влияние аминокислот и пептидов на экспрессию маркера в органотипических культурах клеток селезенки молодых и старых крыс.

Из всех изученных пептидов только Lys-Glu в диссоциированных и органотипических культурах селезенки при их старении стимулирует экспрессию маркера покоящихся макрофагов, CD68. Эти данные могут указывать на то, что стимуляция дифференцировки и пролиферации В-клеток при участии дипептида может быть в том числе обусловлена воздействием цитокинов, выделяемых макрофагами, число которых повышается под действием Lys-Glu.

Модель взаимодействия пептида Lys-Glu и входящих в него аминокислот с ДНК

В результате вычислительных экспериментов была определена энергия сродства аминокислот Lys, Glu и пептида Lys-Glu с участками ДНК, состоящими из 5 пар нуклеотидов (таблица 1). Во всех случаях аминокислоты и пептид

связываются с ДНК со стороны малой бороздки. Результаты докинга показали, что пептид Lys-Glu во всех случаях, кроме последовательности 5'CGCGC3', образует более энергетически выгодные комплексы с азотистыми основаниями ДНК, чем при взаимодействии отдельных аминокислот. Аминокислота Glu и пептид Lys-Glu формировали наиболее энергетически выгодные комплексы с последовательностью 5'АТАТА3' (таблица 1). Аминокислота Lys образовывала наиболее энергетически выгодный комплекс с последовательностью 5'АТGCA3'. Было проведено сравнение характера связывания пептида Lys-Glu и отдельных аминокислот Lys и Glu с последовательностью ДНК 5'АТАТА3'. Так, на рисунках 13А и 13Б изображены рассчитанные методом докинга локализации аминокислот Glu и Lys в малой бороздке ДНК с последовательностью 5'АТАТА3'. Аминокислоты по-разному связываются с ДНК, образуя водородные связи с разными атомами макромолекулы.

Таблица 1.

Решения докинга аминокислот и пептида в последовательности ДНК

Лиганд	Последовательность ДНК, S [ккал/моль]						
	AAAAA	CCCCC	АТАТА	CGCGC	АТGCA	GCAGC	TGTGT
Glu	-3,85	-4,21	-4,57	-3,96	-4,27	-4,3	-4,5
Lys	-4,1	-4,55	-4,87	-5,1	-5,22	-5,03	-5,12
Lys-Glu	-4,86	-4,98	-7,03	-4,96	-6,14	-5,72	-6,01

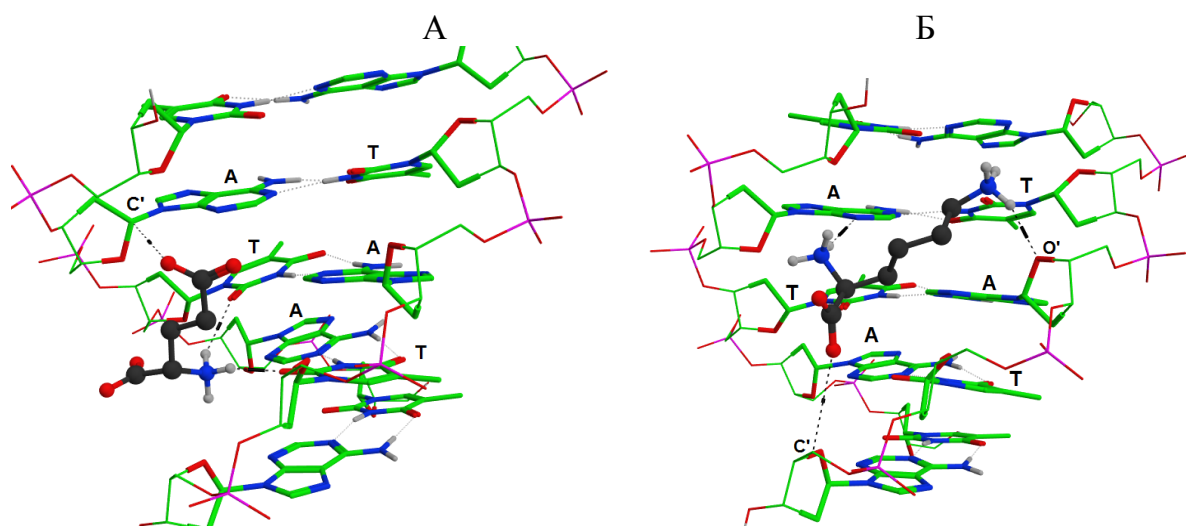


Рисунок 13. Пространственная структура: **А** - комплекса аминокислоты Glu с последовательностью ДНК 5'АТАТА3' ($S = -4,57$ ккал/моль) и **Б** - аминокислоты Lys с последовательностью ДНК 5'АТАТА3' ($S = -7,03$ ккал/моль). Молекулы Glu и Lys изображена как *ball and sticks*, молекула ДНК – в виде *tubes*. Пунктиром выделены водородные связи между атомами. А – аденин, Т – тимин, С' – атом углерода сахарофосфатного остова ДНК, О' – атом кислорода сахарофосфатного остова ДНК.

В комплексе Glu с последовательностью 5'АТАТА3' (таблица 2) найдена сеть из трех водородных связей, образованных между аминогруппой Glu и кислородами двух тиминов, и между кислородом боковой цепи Glu и углеродом дезоксирибозы аденина (рисунок 13А). Аминокислота Lys образует с азотистыми основаниями ДНК водородные связи между аминогруппой основной цепи Lys и N3 аденина, между аминогруппой боковой цепи Lys и кислородом дезоксирибозы

аденина и между карбоксильной группой Lys и углеродом сахарофосфатного остова аденина (рисунок 13Б).

Нами была построена модель взаимодействия пептида Lys-Glu с последовательностью 5'АТАТАЗ'. Энергия взаимодействия пептида с последовательностью 5'АТАТАЗ' в 1,55 и в 1,44 раза выше, чем с отдельно взятыми аминокислотами и составила -7,03 ккал/моль. Однако суммарная энергия взаимодействия аминокислот Lys и Glu с 5'АТАТАЗ' составила -9,44 ккал/моль. Пептид взаимодействует с теми же атомами, что и отдельные аминокислоты Lys и Glu, кроме тех взаимодействий, которые были образованы атомами, задействованными в образовании пептидной связи. Поэтому суммарное количество водородных связей между отдельными аминокислотами и ДНК оказалось больше, чем между пептидом и ДНК. Также выявлено, что пептид повторяет расположения отдельных аминокислот в малой бороздке ДНК.

Наиболее энергетически выгодный комплекс пептид Lys-Glu образует с последовательностью 5'АТАТАЗ', которая повторяет ТАТА-бокс в промоторном участке генов. Связывание с этим участком гена может приводить к запуску экспрессии белков, участвующих в пролиферации клеток, что и проявляется в виде увеличения зоны роста эксплантата.

Таким образом, мишенью аминокислот лизина, глутаминовой кислоты и пептида Lys-Glu может являться ДНК. Взаимодействие с ДНК может приводить к активации экспрессии генов, ответственных за пролиферацию клеток, что и объясняет увеличение зоны роста эксплантата селезенки. Впервые были рассчитаны модели взаимодействия аминокислот и пептида с различными последовательностями ДНК и выявлена корреляция между энергией взаимодействия и биологическим эффектом пептида и аминокислот. Полученные данные позволяют предположить, что именно пептидная связь усиливает связывание пептида Lys-Glu с ДНК, что приводит к более выраженному биологическому эффекту в отношении пролиферации клеток в органотипической культуре селезенки.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Старение организма неизбежно сопровождается инволютивными изменениями во всех органах и системах. Поскольку старение иммунной системы начинается значительно раньше с инволюцией тимуса, на вторичные органы иммуногенеза ложится основная нагрузка по обеспечению иммунного ответа.

В связи с этим, иммунные функции селезенки, как одного из основных вторичных органов иммунной системы выходят на первый план. В пожилом возрасте функциональная активность селезенки снижается, однако изменения её иммунной функции при старении до сих пор мало изучено.

Известно, что возрастные изменения в селезенке характеризуются не только морфологической, но и функциональной картиной инволюции. Изменение численности иммунокомпетентных клеток в различных органах и тканях коррелирует с возрастной инволюцией иммунной системы.

Ранее было установлено, что пептид Lys-Glu способствует восстановлению сниженной функции Т-лимфоцитов, а также макрофагов, стимулирует выработку цитокинов, в том числе интерферонов, стимулирует регенерацию тканей, в том числе после лучевой терапии, а так же обладает антионкогенными свойствами [Barykina O.P. et al, 2003; Kazakova T.V. et al., 2002].

Однако молекулярные механизмы и сравнительная биологическая активность пептида Lys-Glu изучены лишь частично. Установлено, что в органотипических и диссоциированных культурах клеток селезенки крыс при их старении *in vitro* пептиды Lys-Glu и Glu-Trp снижали уровень экспрессии маркера Т-лимфоцитов CD5 -, в то время как пептид Ala-Glu-Asp-Gly увеличивал уровень его экспрессии, а пептид Glu-Asp-Arg и аминокислоты Lys и Glu не влияли на его уровень экспрессии.

В отношении В-клеток, находящихся на различных стадиях дифференцировки пептид Lys-Glu оказывал во всех случаях наиболее сильное стимулирующее воздействие. Так под действием пептида Lys-Glu в органотипических культурах клеток селезенки крыс уровень экспрессии маркера зрелых В-лимфоцитов CD20 у старых животных восстанавливался до контрольных значений молодых. В диссоциированных культурах пептид Lys-Glu, а так же Ala-Glu-Asp-Gly и Glu-Trp так же увеличивали интенсивность экспрессии CD20 как у молодых, так и у старых животных.

Как в органотипических, так и в диссоциированных культурах пептид Lys-Glu наиболее сильно влиял на интенсивность экспрессии маркера межклеточных взаимодействий В-лимфоцитов – CD40, стимулировал его экспрессию и восстанавливая значение площади экспрессии до контрольного значения молодых животных. Примечательно, что отдельные аминокислоты Lys и Glu, входящие в состав пептида Lys-Glu не оказывали таких значительных эффектов.

Кроме того, в органотипических и диссоциированных культурах клеток селезенки только под действием пептида Lys-Glu у старых животных наблюдалось усиление экспрессии маркера макрофагов - молекулы CD68.

Таким образом, увеличение интенсивности экспрессии маркеров В-лимфоцитов CD20 и CD40, а так же маркера макрофагов CD68 свидетельствуют о повышении функциональной активности иммунных клеток селезенки.

На основании ранее высказанного предположения о том, что короткие пептиды способны проникать в клетку и эпигенетически регулировать экспрессию генов [Fedoreyeva L.I. et al., 2011], были созданы молекулярные модели взаимодействия пептида Lys-Glu, а так же двух аминокислот, входящих в его состав с последовательностью 5'АТАТАЗ', которая повторяет ТАТА-бокс в промоторном участке генов. Связывание с регуляторным участком гена может приводить к запуску синтеза белков, участвующих в пролиферации клеток селезенки.

При изучении конформационных особенностей пептида Lys-Glu, а так же аминокислот Lys и Glu было показано, что пептид Lys-Glu во всех случаях, кроме последовательности 5'CGCGC3', образует наиболее энергетически выгодные комплексы с азотистыми основаниями ДНК, чем при взаимодействии отдельных аминокислот.

Установлено, что пептид Lys-Glu, а так же аминокислот Lys и Glu связываются с малой бороздкой ДНК по одинаковым последовательностям. Пептид взаимодействует с теми же атомами, что и отдельные аминокислоты Lys и Glu, кроме тех взаимодействий, которые были образованы атомами, задействованными в образовании пептидной связи. По данным молекулярного моделирования пептид Lys-Glu может эпигенетически регулировать экспрессию генов, продукты которых обеспечивают процессы клеточного обновления в культурах клеток селезенки.

Таким образом, одним из важнейших молекулярных аспектов геропротекторного и иммунопротекторного действия пептида Lys-Glu является поддержание функциональной активности клеток селезенки.

ВЫВОДЫ

1. Пептиды Lys-Glu и Glu-Trp снижают уровень экспрессии маркера предшественников В- и Т-лимфоцитов CD5 в диссоциированных культурах клеток селезенки молодых и старых крыс, что может быть связано с индукцией ранних этапов дифференцировки В-лимфоцитов.
2. Пептиды Lys-Glu и Glu-Trp повышали площадь экспрессии маркеров В-лимфоцитов, находящихся на разных ступенях дифференцировки (CD19, CD20, CD23), а так же усиливали экспрессию маркера межклеточных взаимодействий В-лимфоцитов CD40 в диссоциированных культурах клеток селезенки крыс. Пептид Ala-Glu-Asp-Gly так же увеличивал уровень экспрессии CD40 в органотипических и диссоциированных культурах клеток селезенки крыс при старении. Пептиды Lys-Glu и Glu-Trp являются стимуляторами дифференцировки В-клеток, а пептид Ala-Glu-Asp-Gly – активатором взаимодействия В-лимфоцитов с другими типами иммунных клеток.
3. Пептид Lys-Glu стимулирует экспрессию маркера макрофагов CD68 в органотипических и диссоциированных культурах клеток селезенки крыс у старых животных, что указывает на его способность индуцировать защитную функцию селезенки.
4. В промоторных зонах генов, участвующих в пролиферации клеток селезенки, найдена последовательность, с которой происходит комплементарное связывание молекул аминокислот Lys и Glu и пептида Lys-Glu.
5. В основе молекулярного механизма действия пептида Lys-Glu лежит способность эпигенетически регулировать экспрессию генов и, соответственно, стимулировать синтез белков, ответственных за пролиферацию, что способствует, в свою очередь, восстановлению функциональной активности иммунных клеток селезенки при их старении *in vitro*.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Рекомендуется изучение влияния пептида Lys-Glu на различные этапы дифференцировки В-лимфоцитов (маркеры CD24, CD43, CD45R, IgM, IgG, BP-1) методами вестерн-блот анализа и иммуноцитохимии в первичных и перививаемых диссоциированных культурах В-клеток человека и животных при их старении, поскольку данный пептид обладает выраженным иммунопротекторным и геропротекторным действием и геноспецифически регулирует экспрессию кластеров дифференцировки иммунных клеток.
2. Рекомендуется изучить влияние пептида Lys-Glu на экспрессию генов белков CD19, CD20, CD23, CD24, CD40, CD43, CD45R, CD68, IgM, IgG, BP-1 во вторичных органы иммуногенеза в моделях ускоренного старения и при естественном старении у животных методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени.
3. С помощью физико-химических методов исследования (круговой дихроизм, спектрофотометрия, ядерно-магнитный резонанс, визкозиметрия) рекомендуется выявить особенности взаимодействия пептида Lys-Glu с фрагментами ДНК 5'АТАТА3, 5'СГСГС3, что позволит уточнить результаты полученные методом молекулярного моделирования и выявить новые генные мишени действия пептида.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в журналах, включенных в Перечень ВАК Минобрнауки РФ

1. Биологическая активность аминокислот в органотипических культурах тканей / Н.И. Чалисова, Н.С. Линькова, Н.А. Червякова и соавт. // Клеточные технологии в биологии и медицине. – 2013. - №2. – С. 116-120.
2. Иммуномодулирующее действие вилона и его аналога в культурах клеток тимуса человека и животных / Н.Н. Севостьянова, Н.С. Линькова, Н.А. Червякова и соавт. // Клеточные технологии в биологии и медицине. – 2012. - №4. – С. 220-223.
3. Молекулярные аспекты иммунопротекторного действия пептидов в селезенке при ее старении / Н.А. Червякова, Н.С. Линькова, В.Х. Хавинсон и соавт. // Успехи геронтологии. – 2013. –Т. 26. - №2. – С. 224-228.
4. Роль пептидной связи в реализации биологической активности коротких пептидов / В.Х. Хавинсон, Н.С., Линькова Н.А. Червякова и соавт. // Клеточные технологии в биологии и медицине. - 2014. - №4. – С. 237-240.

Статьи в других журналах

5. Пептиды тканеспецифически стимулируют экспрессию сигнальных молекул в культурах клеток селезенки у животных разного возраста / Н.С. Линькова, Н.А. Червякова., Дудков А.В. и соавт. // Геронтология. Научно-практический журнал. – 2014. – Т. 2., №2. – С. 171-177.

Тезисы

6. Влияние коротких пептидов на экспрессию маркера CD20 в клетках селезенки молодых и старых животных / Н.А. Червякова, Н.С. Линькова, А.В. Дудков и соавт. // Пушкинские чтения, СПб, . – 2012. . – С.108.
7. Дипептиды стимулируют иммуногенез в культуре клеток тимуса человека / Н.С. Линькова, Н.А. Червякова, А.В. Дудков, С.М. Тендлер // IV International symposium Interactions of the nervous and immune systems in health and disease –СПб., Россия. – 2013. – С. 119-120.
8. Иммуномодулирующие пептиды снижают уровень апоптоза в клетках селезенки при ее старении / Н.А. Червякова, А.В. Дудков, А.В. Костылев, М.А. Войцеховская // Сб. тез. Научной конференции молодых ученых с международным участием «Актуальные проблемы геронтологии и гериатрии» – 2013. – С. 65.
9. Иммунопротекторное действие дипептидов в лимфоидной ткани / Н.И. Чалисова, Н.А. Червякова, Н.С. Линькова и соавт. // V International Symposium “Interactions of the nervous and immune systems in health and disease” – 2015. – С. 117.
10. Кузнецова, Е.П. Пептиды восстанавливают иммуногенез в селезенке при ее старении / Е.П. Кузнецова, А.В. Костылев, Н.А. Червякова // Матер. Всероссийской молодежной конференции с международным участием «Фундаментальные аспекты старения. Хрупкость: модели, маркеры, фенотипы. Результаты проекта «Хрусталь».- Российский семейный врач. – 2013. – Т.17, №3. – С. 33-36.
11. Молекулярно-клеточные аспекты фармакодинамики геропротекторных пептидов / Н.С. Линькова, Е.А. Червякова, В.Х. Хавинсон и соавт. // «Симпозиум «Антивозрастная медицина: новейшие достижения и перспективы развития» в рамках IV Санкт-Петербургского конгресса по косметологии и эстетической медицине «Невские берега». – 2013. – С.32-33.

УКАЗАТЕЛЬ ЦИТИРУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

Виноградова И.А. и др. Противоаллергические антигистаминные препараты. Обзор рынка // Новая аптека. Эффективное управление. 2014. №12. С. 14-19;

Назаров П.Г. и др. Автономная холинергическая система: перmissive роль в регуляции рецепторных функций тучных клеток // Российский алергологический журнал. 2013. №2. С. 207-208;

Полякова В.О. и др. Инволютивные изменения резидентных клеток тимуса человека при его старении. Геронтологический журнал им. В.Ф. Купревича. 2010. Т.1 С. 48-51;

Хавинсон В.Х. Тетрапептид, обладающий геропротекторной активностью, фармакологическое средство на его основе и способ его применения. Патент РФ № 2157233. 10.10.2000;

Хавинсон В.Х. и др. Пептид, стимулирующий регенерацию нейронов центральной нервной системы, фармацевтическая композиция на его основе и способ ее применения. Патент РФ № 2301678. 27.06.2007;

Хавинсон В.Х. и др. Пептидная регуляция репаративных процессов в органах иммунной системы при ускоренном старении. // Научные ведомости. Серия Медицина. Фармация. 2010. Т. 22, № 93. С. 57-61;

Хавинсон В.Х. и др. Средство, стимулирующее репаративные процессы, и способ его применения. Патент РФ № 2139085 10.10.1999;

Цыган В.Н. Сравнительная оценка иммуномодулирующих свойств препаратов кортексин и ноотропил // Фарматека. 2014. № 20 (293). С. 55-58;

Яковлев Г.М. и др. Иммуностимулирующее средство «Тимоген». Патент РФ № 1582393. 01.04.1990;

Barykina O.P. et al. Combined effect of vilon and cyclophosphane on tumor transplants and lymphoid tissue explants in mice and rats of various age // Adv Gerontol. 2003. Vol. 12. P. 128-31;

Bronte V., Pittet M.J. The spleen in local and systemic regulation of immunity // Immunity. 2013. Vol. 39(5). P. 806–818;

Fedoreyeva L.I. et al. Penetration of Short Fluorescence-Labeled Peptides into the Nucleus in HeLa Cells and *in vitro* Specific Interaction of the Peptides with Deoxyribonucleotides and DNA // Biochemistry. 2011. Vol. 76, № 11. P. 1210-1219;

Kazakova T.B. et al. In vitro effect of short peptides on expression of interleukin-2 gene in splenocytes // Bull Exp Biol Med. 2002. Vol. 133(6). P.614-616;

Khavinson V.Kh., et al. Method of Creating a Cell Monolayer Based on Organotypic Culture for Screening of Physiologically Active Substances // Bull. Exp. Biol. Med. 2012. Vol. 153, N.5. – P. 795-799;

Khavinson V.Kh., et al. Peptide Regulation of Gene Expression and Protein Synthesis in Bronchial Epithelium // Lung. 2014. 192: 781-791;

Schneider D.A., Yan H., Bastos R.G. et al. Dynamics of bovine spleen cell populations during the acute response to *Babesia bovis* infection: an immunohistological study. // Parasite Immunol. – 2011. – Vol. 33, N 1. P. 34-44.