

ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ ПЕПТИДА КЕ НА ДЛИНУ ТЕЛОМЕР ХРОМОСОМ ФГА-СТИМУЛИРОВАННЫХ ЛИМФОЦИТОВ ЧЕЛОВЕКА

В.Х. Хавинсон^{1,2,3}, Н.С. Линькова^{1,4}, А.А. Пендина⁵, О.А. Ефимова⁵, А.С. Кольцова^{5,6}, М.И. Крапивин^{5,6}, А.В. Тихонов⁵, Л.И. Петрова⁵, А.В. Петровская-Каминская^{5,6}, В.С. Баранов^{5,6}

¹ Санкт-Петербургский институт биорегуляции и геронтологии, Санкт-Петербург;

² Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН, Санкт-Петербург;

³ Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова, Санкт-Петербург;

⁴ Академия постдипломного образования ФГБУ ФНКЦ ФМБА России, Москва;

⁵ НИИ акушерства, гинекологии и репродуктологии им. Д.О. Отта, Санкт-Петербург;

⁶ Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург

THE EFFECT OF KE PEPTIDE ON THE TELOMERE LENGTH OF PHA-STIMULATED HUMAN LYMPHOCYTES

V.Kh. Khavinson^{1,2,3}, N.S. Linkova^{1,4}, A.A. Pendina⁵, O.A. Efimova⁵, A.S. Koltsova^{5,6}, M.I. Krapivin^{5,6}, A.V. Tikhonov⁵, L.I. Petrova⁵, A.V. Petrovskaja-Kaminskaia^{5,6}, V.S. Baranov^{5,6}

¹ Saint Petersburg Institute of Bioregulation and Gerontology, Saint Petersburg, Russia;

² Pavlov Institute of Physiology of RAS, Saint Petersburg, Russia;

³ North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov, Saint Petersburg, Russia;

⁴ Academy of Postgraduate Education under FSBU FSCC of FMBA of Russia, Moscow, Russia;

⁵ D.O. Ott Research Institute of Obstetrics, Gynecology and Reproductology, Saint Petersburg, Russia;

⁶ Saint Petersburg State University, Saint Petersburg, Russia

Цель работы — изучить влияние пептида КЕ на длину теломер хромосом ФГА-стимулированных лимфоцитов крови мужчин молодого и среднего возраста. В работе использовали лимфоциты периферической крови 11 человек. Для оценки относительной длины теломер метафазных хромосом проводили флуоресцентную гибридизацию *in situ* с ДНК-зондами, специфичными к теломерным последовательностям хромосом человека. Выявлено 5 случаев достоверного изменения длины теломер лимфоцитов крови. Чаще изменения длины теломер ФГА-стимулированных лимфоцитов регистрировали у лиц среднего возраста: 4 случая против 1. У лиц среднего возраста пептид КЕ увеличивал длину теломер, если она исходно была снижена, и снижал этот показатель, если он исходно был выше среднего значения.

Ключевые слова: пептид КЕ; теломеры; лимфоциты; возраст.

The goal of the research is to study the effect of KE peptide on telomere length of PHA-stimulated blood lymphocytes of young and middle-aged men. 11 blood lymphocyte samples were enrolled in the analysis. Relative telomere length was measured using fluorescence *in situ* hybridization with DNA-probes specific to telomere sequences of human chromosomes. 5 cases of significant telomere length alteration were registered. These changes were more frequent registered in middle-aged people: 4 invents cases versus 1. KE peptide increased telomere length in blood lymphocytes of middle-aged people if it was basically low and, vice versa, decreased the basically high telomere length.

Keywords: KE peptide; telomeres; lymphocytes; age.

Введение. Пептиды играют важную роль в регуляции старения организма на тканевом и клеточном уровнях. Ключевым проявлением клеточного старения является уменьшение длины теломер и достижение лимита Хейфлика. Установлено, что длина теломер коррелирует с концентрацией С-пептида в крови в норме и при метаболических нарушениях [6]. Пептид КЕ (Lys-Glu, Вилон) — представитель пептидных тимомиметиков, который был обнаружен в составе полипептидного комплекса Тималина. Пептид КЕ стимулирует клеточный иммунитет и неспецифическую резистентность организма, оказывает активирующее действие на

макрофаги, лимфоциты крови, тимоциты и нейтрофилы [3–4]. Пептид КЕ при введении в организм трансгенных мышей подавляет экспрессию онкогена HER-2/neu в 2 раза, что сопровождается уменьшением диаметра опухоли [1]. Кроме того, пептид КЕ способствует увеличению доли транскрибируемого эухроматина и снижению количества гетерохроматина в лимфоцитах крови лиц старческого возраста [5]. В связи с этим целью работы стало исследование влияния пептида КЕ на длину теломер ФГА-стимулированных лимфоцитов крови людей разного возраста.

Материал и методы исследования. В работе использовали лимфоциты периферической

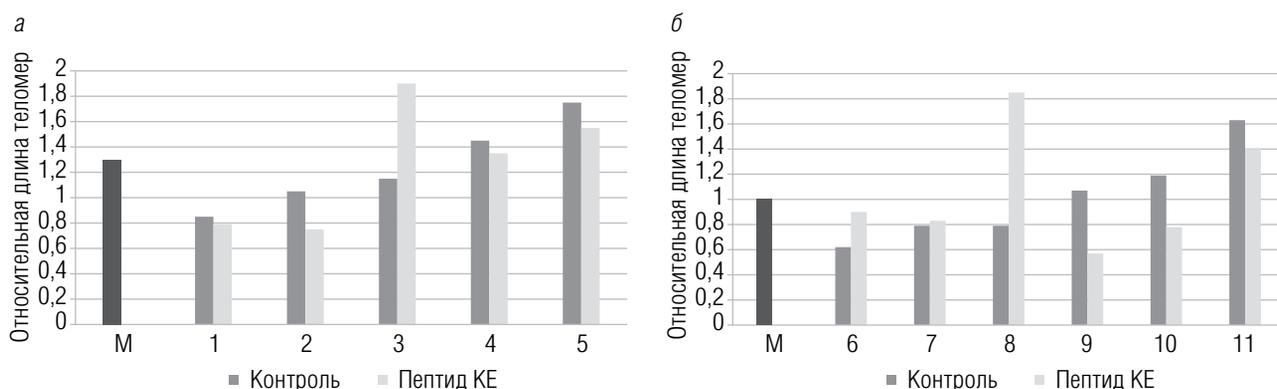


Рис. 1. Относительная длина теломерных районов хромосом лимфоцитов, культивированных без пептида (контроль) и с добавлением пептида КЕ у лиц молодого (а) и среднего (б) возраста. По оси X цифрами обозначены номера индивидов, от которых получены образцы крови. Символом (*) показаны достоверные изменения относительной длины теломер лимфоцитов после воздействия пептида в сравнении с контролем: * $p < 0,05$, ** $p < 0,001$, *** $p < 0,0001$ (критерий Манна – Уитни). Столбец «М» и черная линия на гистограмме обозначают среднее в возрастной группе значение относительной длины теломерных районов хромосом лимфоцитов, культивированных без добавления пептида

крови 5 мужчин молодого (18–22 лет) и 6 мужчин среднего (49–54 лет) возраста. Критерием включения в исследование являлось отсутствие у индивидов табачной, алкогольной и наркотической зависимости, симптомов острой вирусной инфекции в течение месяца до забора крови, хронических заболеваний, а также систематического приема лекарственных препаратов. Культивирование лимфоцитов проводили с использованием полумикрометода по стандартной методике с использованием митогена фитогемагглютинаина (ФГА) [2]. На 48-м часу культивирования во флаконы добавляли пептиды КЕ в конечной концентрации 1000 нг/мл. В контрольные культуры пептид не добавляли. На 71-м часу культивирования во флаконы добавляли 1 % раствор колхицина. Фиксацию суспензии клеток проводили с помощью раствора, состоящего из метанола и ледяной уксусной кислоты в соотношении 3 : 1. Суспензию клеток раскапывали на охлажденные до +4 °С мокрые предметные стекла над паровой баней.

Для оценки относительной длины теломер метафазных хромосом проводили флуоресцентную гибридизацию *in situ* с ДНК-зондами, специфичными к теломерным последовательностям хромосом человека (Telomere PNA Kit/Су3, ДАКО, США) и к локусу в коротком плече хромосомы 9 — CDKN2A — (AbbottMolecular, США), в качестве реперного зонда. После проведения флуоресцентной гибридизации *in situ* получали фотоизображения метафазных пластинок, на которых с помощью программы ImageJ 1.48v рассчитывали средние значения интенсивности флуоресценции, соответствующие размеру гибридизационного сигнала ДНК-зонда к теломерным последовательностям на хромосомах 1, 9, 16. Для нивелирования влияния конденсации хромосом

на результат измерения, вычисляли среднюю относительную длину теломер хромосом, которую определяли путем отношения среднего значения интенсивности флуоресценции гибридизационного сигнала теломер-специфических ДНК-зондов к среднему значению интенсивности флуоресценции гибридизационного сигнала реперного ДНК-зонда. Всего произведено измерение интенсивности флуоресценции 7140 гибридизационных сигналов на 255-ти метафазных пластинках.

Статистический анализ проводили с использованием программного обеспечения GraphPad Prism Version 6.01. Для анализа изменений митотического индекса лимфоцитов после воздействия пептидов применяли критерий Хи-квадрат с поправкой Йейтса для таблиц сопряженности. Для анализа изменений относительной длины теломер хромосом ФГА-стимулированных лимфоцитов после воздействия пептидов использовали критерий Манна – Уитни. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты и их обсуждение. Относительная длина теломер хромосом из ФГА-стимулированных лимфоцитов без воздействия пептида варьировала от 0,86 до 1,75 и от 0,63 до 1,64 у лиц молодого и среднего возраста, соответственно. Однако достоверных различий по этому параметру между группами установлено не было, хотя наблюдалась тенденция к снижению относительной длины теломер в старшей возрастной группе (рис. 1).

После воздействия пептида КЕ было установлено достоверное увеличение относительной длины теломер в ФГА-стимулированных лимфоцитов одного испытуемого молодого возраста (№ 3) на 65 % и у двух лиц среднего возраста (№ 6, 8) на 46 и 137 %, соответствен-

но. Достоверное уменьшение показателя наблюдалось в ФГА-стимулированных лимфоцитах двух индивидов среднего возраста (№ 9, 10) на 47 и 35 %, соответственно (см. рис. 1).

Заключение. Таким образом, пептид КЕ вызвал изменение длины теломер ФГА-стимулированных лимфоцитов у 5 из 11 индивидов. В большинстве случаев достоверные изменения длины теломер ФГА-стимулированных лимфоцитов были зарегистрированы у лиц среднего

возраста: 4 случая против 1. При этом была отмечена тенденция к «нормализации» длины теломер ФГА-стимулированных лимфоцитов после воздействия пептида у лиц среднего возраста, то есть к увеличению длины в случае, если ее значение без воздействия было меньше среднего в группе, и уменьшению — если ее значение было больше, чем среднее в группе. У лиц молодого возраста такой тенденции отмечено не было.

Литература

1. Хавинсон В.Х. Пептидная регуляция старения. — СПб.: Наука, 2009. — 50 с.
2. Кузнецова Т.В., Логинова Ю.А., Чиряева О.Г., и др. Цитогенетические методы. Медицинские лабораторные технологии. Т. 2. / Ред. А.И. Карпищенко. — М.: ГЭОТАР-Медиа, 2013. — 792 с.
3. Севостьянова Н.Н., Линькова Н.С., Полякова В.О., и др. Иммуномодулирующее действие вилона и его аналога в культурах клеток тимуса человека и животных // Клеточные технологии в биологии и медицине. — 2012. — № 4. — С. 220–223.
4. Щербак В.А., Патеюк А.В. Влияние вилона на иммунный ответ при остром иммобилизационном стрессе у крыс // Сибирский медицинский журнал. — 2004. — Т. 44. — № 3. — С. 26–29.
5. Khavinson VKh, Lezhava TA, Malinin VV. Effects of short peptides on lymphocyte chromatin in senile subjects. *Bull. Exp. Biol. Med.* 2004;137(1):78-81.
6. Yang M, Jiang P, Jin C, Wang J. Longer Telomere Length and its Association with Lower Levels of C-Peptide. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2017;8:244.