

СРАВНИТЕЛЬНОЕ ВЛИЯНИЕ ПЕПТИДОВ KE И EW НА РОСТ НОРМАЛЬНЫХ И ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК

Н.С. Линькова^{1,2}, Е.С. Миронова¹, О.М. Ивко¹, О.А. Орлова¹, А.В. Дудков¹

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

² Академия постдипломного образования ФГБУ ФНКЦ ФМБА России, Москва

COMPARATIVE EFFECT OF KE AND EW PEPTIDES ON NORMAL AND TUMOR IMMUNE CELLS

N.S. Linkova^{1,2}, E.S. Mironova¹, O.M. Ivko¹, O.A. Orlova¹, A.V. Dudkov¹

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

² Academy of Postgraduate Education under FSBU FSCC of FMBA of Russia, Moscow, Russia

Пептиды KE и EW обладают иммунопротекторным и онкостатическим эффектом в экспериментальных исследованиях. Однако их сравнительное действие на нормальные и раковые иммунные клетки до сих пор не проводилось. **Цель работы** — изучить влияние пептидов KE и EW на рост Т-лимфоцитов и клеток лимфомы Беркитта в культуре. Для построения кривой клеточного роста клетки рассеивали в концентрации 20 000 на 2 мл. Пептиды KE и EW добавляли в культуры в концентрации 100 нг/мл. Подсчет клеток осуществляли в камере Горяева. Пептиды KE и EW повышали количество лимфоцитов крови человека по сравнению с контролем на протяжении всех 5 суток культивирования (на 64–219%). Пептиды KE и EW снижали число клеток лимфомы Беркитта по сравнению с контролем на протяжении 5 суток культивирования (на 37–101%). Пептиды KE и EW подавляют пролиферацию опухолевых иммунных клеток и стимулируют рост нормальных лимфоцитов костного мозга человека. Возможно, что разнонаправленное влияние пептидов KE и EW на нормальные и раковые иммунные клетки связано с различиями в пептидной регуляции статуса метилирования ДНК в этих клетках.

Ключевые слова: Т-лимфоциты; лимфома Беркитта; короткие пептиды; клеточные культуры.

KE and EW peptides have an immunoprotective and oncostatic effect in experimental studies. However, their comparative effect on normal and cancer immune cells has not been carried out yet. The aim of the work is to study the effect of KE and EW peptides on T-lymphocytes and Burkitt lymphoma cells growth in culture. To plot the cell growth curve, the cells were scattered at a concentration of 20,000 per 2 ml. KE and EW peptides were added to cultures at 100 ng/ml. Counting cells was carried out in the Gorjaev's chamber. KE and EW peptides increased the number of lymphocytes of human blood as compared with the control during 5 days by 64–219%. KE and EW peptides reduced the number of Burkitt lymphoma cells as compared with the control during 5 days by 37–101%. KE and EW peptides decreased tumor immune cell proliferation and increased normal human lymphocytes grow. We suppose, that these effects can be connected with various ways of peptide regulation of methylation status of DNA.

Keywords: T-lymphocytes; Burkitt's lymphoma; short peptides; cell cultures.

Введение. Известно, что при старении наибольшим возрастным изменениям подвергается иммунная система. Снижение функциональной активности иммунной системы выражается в возрастной инволюции тимуса, инволютивно-дистрофических и склеротических изменениях тканей селезенки. Учитывая способность пептидных биорегуляторов влиять на экспрессию генов и синтез белков, участвующих в пролиферации, дифференцировке и апоптозе клеток при их старении [3, 5], перспективным представляется изучение влияния коротких пептидов KE (вилон) и EW (timoген) на клетки иммунной системы.

Дипептид KE в дозе 100 мкг/кг стимулировал пролиферацию В-лимфоцитов в селезенке животных. Пептид KE в концентрациях от 10 нг/л до 100 мкг/л повышал содержание

внутриклеточного Ca^{2+} в тимоцитах и макрофагах, что является одним из механизмов активации этих клеток [4]. Пептид KE угнетал спонтанный канцерогенез у самок мышей линии СВА: снижал частоту развития опухолей в 1,5 раза и множественность новообразований — в 1,9 раза. Под действием пептида KE у мышей в 2,5 раза реже развивались аденомы легких и наблюдалась тенденция к снижению частоты развития аденокарцином молочной железы [1–2, 6–7].

Дипептид EW — синтетический иммуномодулирующий лекарственный препарат, регулирующий реакции клеточного, гуморального иммунитета и неспецифическую резистентность организма, стимулирующий регенерацию тканей и кроветворение. Пептид EW усиливал реакцию бласттрансформации

лимфоцитов и оказывал модулирующее влияние на уровень провоспалительных цитокинов — IL-1 α , IL-8 и TNF- α . В условиях экспериментально вызванных иммунодефицитов у животных пептид EW приводил к нормализации Т- и В-клеточного иммунитета. У морских свинок, инфицированных псевдотуберкулезом, введение пептида EW в течение 6–15 сут приводило к нормализации клеточного состава тимуса и селезенки, повышению функциональной активности лимфоцитов и нейтрофилов. У самок крыс введение пептида EW 5 раз в неделю в течение 12 мес способствовало 2-кратному снижению частоты развития злокачественных новообразований (лейкозы, лимфомы) [1]. В условиях экспериментально индуцированных опухолей желудочно-кишечного тракта у крыс (папилломы, карциномы) введение пептида EW на 12 % уменьшило частоту развития опухолей и в 1,7 раза снизило множественность их возникновения [1, 7].

При этом сравнительное влияние пептидов KE и EW на нормальные и раковые иммунные клетки до сих пор не проводилось.

Целью работы явилось определение влияния пептидов KE и EW на рост Т-лимфоцитов костного мозга человека и клеток лимфомы Беркитта в культуре.

Материалы и методы исследования. Для исследования влияния пептидов на кривую клеточного роста использовали линии диссоциированных культур клеток человека, полученные из Российской коллекции клеточных культур позвоночных Института цитологии РАН (Санкт-Петербург): Т-лимфоциты костного мозга человека (линия Т-1387) и лимфома Беркитта (линия Namalva). Для построения кривой клеточного роста клетки 3 пассажа рассеивали в 24-луночные планшеты. В каждую ячейку планшета добавляли клетки в концентрации 20 000 на 2 мл, среду и пептиды KE и EW в концентрации 100 нг/мл добав-

ляли таким образом, чтобы общий объем питательной среды в ячейке составлял 2 мл. В контрольных образцах вместо пептида добавляли аналогичное количество питательной среды. Подсчет клеток осуществляли в камере Горяева. Статистическая обработка данных включала в себя подсчет среднего арифметического, стандартного отклонения от среднего и доверительного интервала для каждой выборки и проводилась в программе «Statistica 7.0». Для анализа вида распределения и проверки нулевой гипотезы использовали критерий Шапиро – Уилка. Для оценки статистической однородности нескольких выборок использовали непараметрические процедуры однофакторного дисперсионного анализа (критерий Крускала – Уоллиса). Различия между группами считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты исследования и их обсуждение. Под действием пептидов KE и EW на 2, 3, 4 и 5 сутки культивирования количество Т-лимфоцитов достоверно повышалось соответственно на 95 и 86 %, на 136 и 157 %, на 147 и 219 % и на 64 и 91 % (рис. 1). На 2 сутки культивирования под действием пептидов KE и EW количество клеток лимфомы Беркитта имело тенденцию к снижению, но достоверно от контроля не отличалось. На 3, 4 и 5 сутки культивирования после добавления пептидов KE и EW количество клеток лимфомы Беркитта снижалось соответственно на 64 и 66 %, на 101 и 63 %, на 65 и 37 % (рис. 2).

Пептиды KE и EW повышали количество Т-лимфоцитов крови человека по сравнению с контролем на протяжении 5 сут культивирования. Пептид EW обладал большей иммуностимулирующей активностью по сравнению с пептидом KE, повышая количество лимфоцитов за 4 сутки культивирования более, чем в 2 раза. Пептиды KE и EW снижали число клеток лимфомы Беркитта на протяжении 5 сут культивирования. Пептид KE обладал большей

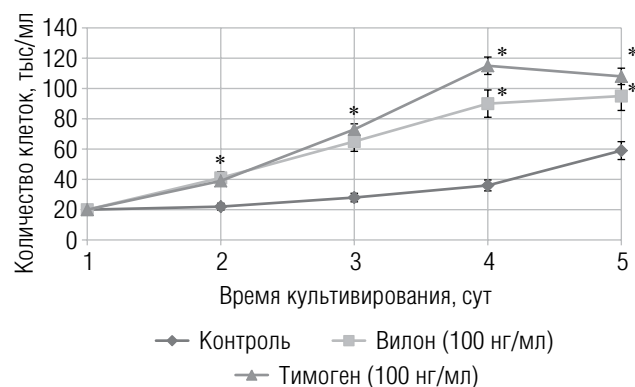


Рис. 1. Влияние пептидов KE, EW на ход кривой клеточного роста лимфоцитов крови человека. * $p < 0,05$ по сравнению с соответствующим значением в контроле

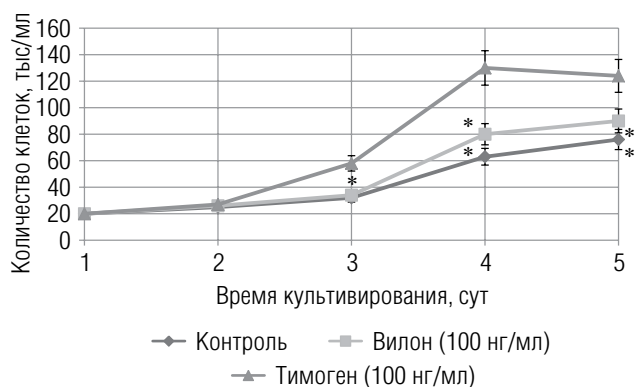


Рис. 2. Влияние пептидов KE, EW на ход кривой клеточного роста клеток лимфомы Беркитта. * $p < 0,05$ по сравнению с соответствующим значением в контроле

противоопухолевой активностью по сравнению с пептидом EW. Полученные данные согласуются с имеющимися в литературе сведениями по исследованию противоопухолевой активности пептидов [1–2, 4–7]. Пептиды KE и EW подавляют пролиферацию опухолевых иммунных клеток и стимулируют рост нормальных лимфоцитов костного мозга человека. Известно, что у нормальных и раковых, «молодых» и «ста-

рых» клеток статус метилирования ДНК отличается. При этом пептиды модулируют статус метилирования ДНК в «старых» клетках, делая его сходным с «молодыми» клетками [3]. Возможно, что разнонаправленное влияние пептидов KE и EW на нормальные и раковые иммунные клетки связано с различиями в пептидной регуляции статуса метилирования ДНК в этих клетках.

Литература

1. Анисимов В.Н., Мирецкий Г.И., Морозов В.Г., и др. Влияние синтетического иммуномодулятора тимогена на радиационный канцерогенез у крыс // Вопросы онкологии. – 1992. – Т. 38. – № 4. – С. 451–458.
2. Анисимов В.Н., Хавинсон В.Х. Применение пептидных биорегуляторов для профилактики рака: результаты 35-летних исследований и перспективы // Вопросы онкологии. – 2009. – Т. 55. – № 3. – С. 291–304.
3. Ашапкин В.В., Линькова Н.С., Хавинсон В.Х., Ванюшин Б.Ф. Эпигенетические механизмы пептидергической регуляции экспрессии генов при старении клеток человека // Биохимия. – 2015. – Т. 80. – Вып. 3. – С. 374–388.
4. Хавинсон В.Х. Пептидная регуляция старения. – СПб.: Наука, 2009. – 50 с.
5. Anisimov VN, Khavinson VKh. Peptide bioregulation of aging: results and prospects. *Biogerontology*. 2010;11(2):139-149.
6. Anisimov VN, Khavinson VKh, Mikhalski AI, Yashin AI. Effect of synthetic thymic and pineal peptides on biomarkers of ageing, survival and spontaneous tumour incidence in female CBA mice. *Mech. Ageing Dev.* 2001;122:41-68.
7. Anisimov VN, Khavinson VKh, Morozov VG. Immunomodulatory synthetic dipeptide L-Glu-L-Trp slows down aging and inhibits spontaneous carcinogenesis in rats. *Biogerontology*. 2000;1:55-59.