

## ПЕПТИДНАЯ РЕГУЛЯЦИЯ РЕПАРАТИВНЫХ ПРОЦЕССОВ В ОРГАНАХ ИММУННОЙ СИСТЕМЫ ПРИ УСКОРЕННОМ СТАРЕНИИ

**В.Х. Хавинсон, Н.С. Линькова  
И.М. Кветной, В.О. Полякова  
А.В. Трофимов, Н.Н. Севостьянова  
Р.И. Абдулрагимов**

*Санкт-Петербургский  
институт биорегуляции и  
Геронтологии,  
СЗО РАМН*

*e-mail: miayu@yandex.ru*

Проведено исследование влияния пептида Т-38 на процессы пострадиационного восстановления ключевых органов иммунной системы – тимуса и селезенки крыс в модели ускоренного старения. Показано, что иммуногеропротекторный эффект пептида Т-38 выразался в восстановлении структуры сосудистого русла иммунных органов и усилении пролиферативной активности клеток тимуса и селезенки.

Ключевые слова: тимус, селезенка, ускоренное старение, пролиферация, пептиды.

Основной задачей современной иммунобиogerонтологии является изучение механизмов старения важнейших органов иммунной системы – тимуса и селезенки, а так же поиск путей коррекции возрастной инволюции указанных органов [5]. Известно, что старение тимуса начинается с момента полового созревания, а в пожилом и старческом возрасте его функциональная активность резко снижается [1]. Возрастная атрофия тимуса приводит к снижению иммунологической активности селезенки, что проявляется в снижении Т-хелперной активности [2]. Многолетний опыт применения коротких пептидов в терапии стресс-индуцированных иммунодефицитов, преждевременного старения и возрастной патологии показал, что пептидергическая регуляция гомеостаза организма может являться одним из перспективных направлений практической геронтологии и гериатрии [3-4, 6-7]. В связи с этим представляется важным исследование репаративной способности тимуса и селезенки в модели ускоренного старения под действием пептидов.

**Материалы и методы исследования** Исследования выполнены на 20 самцах крыс линии Вистар в возрасте 2,5 месяцев с массой тела 140-150 г. Животные были разделены на 4 группы: 1 группа – контроль, 2 группа –  $\gamma$ -облучение, 3 группа –  $\gamma$ -облучение с последующим введением контрольного пептида Т-34 (Н-Glu-Asp-Gly-ОН, хонлутен) в дозе 20 нг/ мл и 4 группа –  $\gamma$ -облучение с последующим введением опытного пептида Т-38 (Н-Lys-Glu-Asp-ОН, везуген) в дозе 20 нг/ мл.

Общее однократное облучение животных 2, 3 и 4 групп в дозе 7 Гр. выполнено на кобальтовом аппарате ЛУЧ при мощности 32 сГр/мин.

В качестве опытного пептида был выбран Т-38, поскольку он оказывает влияние на сосудистую систему, которая наиболее подвержена радиационному старению. В качестве контрольного (сравнительного) пептида был выбран Т-34, имеющий сродство к дыхательной системе и не влияющий на сосудистый компонент. Исследуемые пептиды вводили животным внутривентриально через 2 часа после облучения по 0,5 мкг в течение 5 дней. Крысам 1 группы по той же схеме вводили физраствор. Выделение тимуса и селезенки проведено под нембуталовым наркозом в дозе 50 мг/кг на 7 сутки после облучения.

Кусочки тимуса и селезенки объемом 1 см<sup>3</sup> фиксировали и обезвоживали, а затем заключали в парафин. Срезы толщиной 3-5 мкм помещали на предметные стекла и окрашивали гематоксилином и эозином.

Изучение пролиферативной активности тканей тимуса и селезенки крыс методом иммуногистохимии проводили с применением мышиных моноклональных антител к маркеру пролиферации клеток PCNA (1:50, Dako) согласно стандартному протоколу.



Морфометрическую оценку данных выполняли на микроскопе Olympus CX41 с цифровой камерой Nikon Coolpix 4500 с помощью системы анализа микроскопических изображений Analysis 5.0. Индекс пролиферации PCNA рассчитывали в процентах как отношение количественной плотности иммуноокрашенных ядер к количественной плотности ядер клеток, окрашенных гематоксилином. Статистическая обработка результатов выполнялась в программе Statistica 6,0.

**Результаты исследования В 1 группе (контроль):** внешний вид и внутренние органы животных соответствовали норме. Весовой диапазон для селезенки составил 570-870 мг, для тимуса – 400-550 мг.

**Тимус.** На гистологических срезах тимус интактных крыс имел дольчатое строение. В дольках отчетливо различалось более темное, расположенное снаружи корковое вещество и более светлое центрально расположенное мозговое вещество (рис. 1А). Основная популяция пролиферирующих клеток в тимусе интактных животных по индексу PCNA составила  $23,6 \pm 1,4\%$  (рис. 3) и располагалась в слое коркового вещества с тенденцией концентрироваться в периферической зоне долек.

**Селезенка.** У крыс контрольной группы гистологический рисунок селезенки соответствовал вариантам нормы (рис. 2А). Соединительно-тканная капсула органа была относительно тонкой и содержала многочисленные коллагеновые волокна.

Белая пульпа была представлена совокупностью лимфоидных периартериальных муфт и фолликулов округлой формы. В центрах размножения фолликулов выявлялись делящиеся клетки и отдельные лимфоциты, погибающие путем апоптоза. Красная пульпа состояла из тяжелой и венозных синусов, заполненных форменными элементами крови. В субкапсулярной зоне красной пульпы и вдоль трабекул располагались небольшие очаги экстрамедуллярного кроветворения.

На препаратах, иммуноокрашенных на PCNA, пролиферирующие клетки были сконцентрированы, в основном, в центрах размножения лимфоидных фолликулов и зонах гемопоэза, где индекс пролиферативной активности составил  $35,4 \pm 1,0\%$  (рис. 4).

**У облученных животных (2 группа)** внутренние органы были умеренно анемичны, мезентериальные лимфоузлы имели темный цвет. Тимус и селезенка были уменьшены в размерах. Масса селезенки варьировала от 220 до 400 мг, тимуса – от 90 до 140 мг.

**Тимус.** На гистологических срезах размеры долек были значительно уменьшены. Деление на корковое и мозговое вещество стиралось, а в некоторых дольках исчезала граница между слоями (рис. 1Б). Похожие инволютивные изменения выявляются и при естественном старении тимуса у лиц старше 60 лет. Клеточность коркового вещества снижалась, однако пролиферативная активность тимоцитов по индексу PCNA возрастала по сравнению с контролем (рис. 3), что свидетельствует о пострадиационном восстановлении ткани тимуса.

В мозговом веществе деструктивные изменения были менее выражены. Соотношение между паренхимой и стромой нарушалось в сторону увеличения последней. Отмечался отек сосудов соединительно-тканых перегородок. Строма была набухшая, отечная, с жировой инфильтрацией по периферии долек.

**Селезенка.** После облучения в ткани селезенки отмечалось сокращение белой пульпы и атрофия периартериальных муфт. На месте лимфоидных фолликулов были видны центральные артерии, окруженные узким ободком перифолликулярной ретикулярной ткани, в которой можно было обнаружить единичные скопления распадающихся лимфоцитов, плазматических и ретикулярных клеток (рис. 2Б). Стенки кровеносных сосудов белой пульпы и соединительно-тканых трабекул были отечными и частично гомогенизированными за счет плазматического пропитывания. Периферические синусы в селезенке переполнялись кровью, а строма в субкапсулярной зоне была практически оголена. Клеточность в субкапсулярной зоне снижалась более чем в 2 раза, однако по периферии селезенки пролиферативная активность клеток по PCNA возрастала до  $58,3 \pm 3,0\%$  (рис. 4).

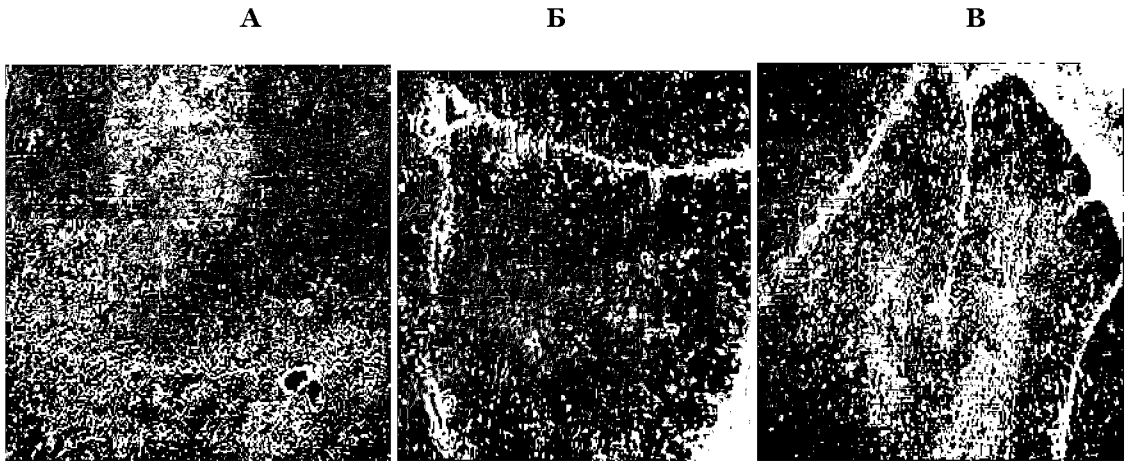


Рис. 1. Кортиковое и мозговое вещество долек тимуса, окрашивание гематоксилином и эозином,  $\times 120$ :  
 А – 1 группа (контроль), Б – 2 группа (облучение), В – 4 группа (облучение + пептид Т-38)

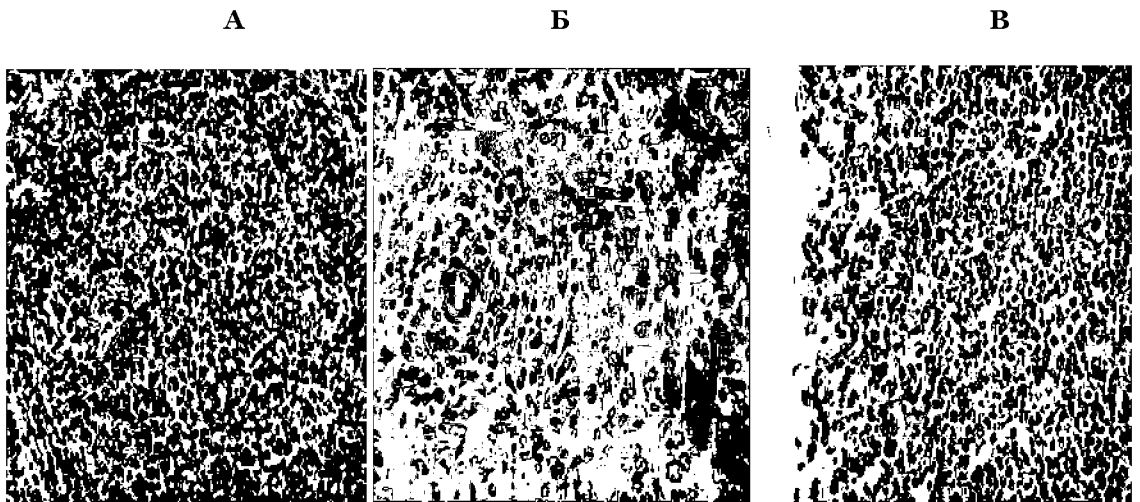


Рис. 2. Лимфатический фолликул селезенки, окрашивание гематоксилином и эозином,  $\times 480$ :  
 А – 1 группа (контроль), Б – 2 группа (облучение), В – 4 группа (облучение + пептид Т-38)

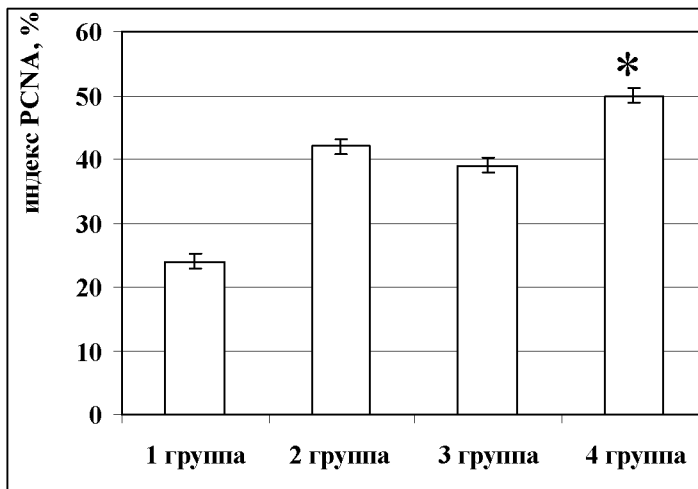


Рис. 3. Проллиферативная активность в корковой зоне тимуса по индексу PCNA:  
 \* –  $p < 0.05$  по сравнению с 1 группой (контроль), 2 группой (облучение) и 3 группой (облучение + пептид Т-34).

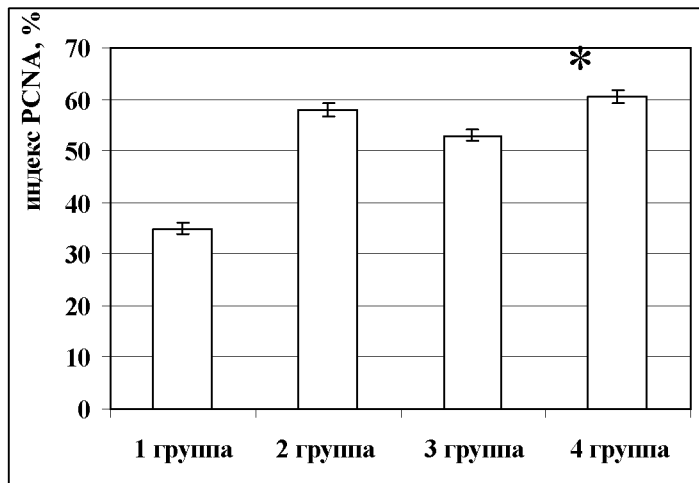


Рис. 4. Пролиферативная активность в субкапсулярной зоне селезенки по индексу PCNA:  
\* –  $p < 0.05$  по сравнению с 1 группой (контроль) и 3 группой (облучение + пептид Т-34)

#### **У облученных животных на фоне введения пептида Т-34 (3 группа)**

в тимусе и селезенке отмечались деструктивные изменения, характерные для тех, которые были описаны во 2 группе. Однако, индекс пролиферативной активности в тканях обоих исследуемых иммунных органов снижался по сравнению со 2 группой (рис. 3, 4). Полученные данные свидетельствуют, что контрольный пептид Т-34, не обладающий тканеспецифичностью к иммунным клеткам и сосудистой системе, не оказывает репаративного эффекта в модели ускоренного старения тимуса и селезенки.

#### **У облученных животных на фоне введения пептида Т-38 (4 группа)**

ткани тимуса и селезенки не имели признаков анемии, характерных для животных 2 и 3 групп.

**Тимус.** Пострадиационное введение пептида Т-38 способствовало восстановлению дифференциации долек тимуса на корковое и мозговое вещество (рис. 1В). По периферии коркового вещества наряду с увеличением клеточности появлялись крупные лимфобласты. В мозговом веществе были видны скопления крупных клеток, формирующих эпителиальную сеть. Кровеносные капилляры были сужены, без выраженных признаков периваскулярного отека.

PCNA<sup>+</sup> клетки верифицировались по всей площади коркового вещества. Индекс пролиферативной активности возрастал почти на 50% относительно контроля и был выше, чем в других исследуемых группах (рис. 3).

**Селезенка.** Под действием пептида Т-38 после облучения в селезенке определялось относительное увеличение содержания белой пульпы и появление крупных гемопоэтических островков. В лимфатических фолликулах и парафолликулярной зоне повышалось содержание крупных лимфоцитов, многие из которых находились в состоянии митотического деления, что косвенно предполагает активацию процессов репаративной регенерации в селезенке (рис. 2В). Группы PCNA<sup>+</sup> клеток были верифицированы по всей паренхиме селезенки, причем в зонах гемопоэза они формировали обширные скопления. Индекс PCNA имел тенденцию к повышению по сравнению с группой облученных животных и достоверно возрастал по сравнению с контролем (рис. 4).

**Закключение.** Облучение вызывает ряд патологических процессов в тимусе и селезенке, которые на уровне органов выражаются в снижении их массы, а на уровне тканей проявляются в деструкции сосудистого русла, отеке, снижении клеточности иммунных органов. Все перечисленные изменения на органном и тканевом уровнях сходны с проявлениями естественной инволюции иммунной системы при старении.



Эффекты пептидов в модели ускоренного старения определяются их тканеспецифичностью. Так, пептид Т-34, тропный к тканям дыхательной системы, не влиял на состояние облученных тканей, а в некоторых случаях даже способствовал замедлению их восстановления. Однако под действием пептида Т-38, эффекты которого направлены на сосудистое русло, наблюдалась репарация тканей тимуса и селезенки и усиление пролиферативной активности иммунных клеток в них, при этом патология сосудистого русла, индуцированная облучением, полностью отсутствовала.

Полученные данные показали, что пептид Т-38, воздействуя на сосудистый компонент, восстанавливает структуру и функциональную активность органов иммунной системы при их ускоренном старении, что позволяет рекомендовать его в качестве геропротекторного средства при развитии иммунодефицитных состояний.

### Литература

1. Кветной, И.М. Нейроиммуноэндокринные механизмы регуляции пролиферативной активности тимоцитов в постнатальном онтогенезе / И.М. Кветной и др. // Мед. академ. журнал. – 2004. – Т. 47. – № 4. – С. 52-58.
2. Полякова В.О. Тимус и старение / В.О. Полякова и др. // Успехи геронтол. – 2001. – Вып. 8. – С. 50-57.
3. Хавинсон, В.Х. Пептидная регуляция старения / В.Х. Хавинсон. – СПб.: Наука, 2009. – 50 с.
4. Хавинсон, В.Х. Пептидная регуляция старения: 35-летний опыт исследований / В.Х.Хавинсон, В.Н. Анисимов // Бюлл. эксп. биол. и мед. – 2009. – Т. 148. – № 7. – С. 108-113.
5. Хавинсон, В.Х. Пептидная регуляция иммунобиологических механизмов старения / В.Х. Хавинсон, В.В. Малинин // Аллергология и иммунология. – 2008. – Т. 9. – № 4. – С. 443-444.
6. Хавинсон, В.Х. Пептиды эпифиза и тимуса в регуляции старения / В.Х. Хавинсон, В.Г. Морозов. – СПб.: Фолиант, 2001. – 160 с.
7. Anisimov, V.N. Peptide bioregulation of aging: results and prospects / V.N. Anisimov, V.Kh. Khavinson // Biogerontology. – 2010. – Vol. 11. – P. 139-149.

## PEPTIDE REGULATION OF REPARATIVE PROCESSES IN IMMUNE SYSTEM'S ORGANS AT ACCELERATED AGEING

**V. Kh. Khavinson, N. S. Linkova  
I.M. Kvetnoy, V.O. Polyakova  
A.V. Trofimov, N.N. Sevostianova  
R.I. Abdulragimov**

*Institute of bioregulation  
and gerontology,  
Russian Academy  
of Medical Sciences  
Saint-Petersburg*

*e-mail: miayy@yandex.ru*

Effect of peptide T-38 has been studied in model of accelerated ageing of the main immune organs – thymus and spleen. Immunogeroprotective effect of peptide T-38 was connected with reparation of bloodstream in thymus and spleen and increase proliferative activity immune cells.

Key words: thymus, spleen, accelerated ageing, proliferation, peptides.