

## **ВЛИЯНИЕ ГЕРОПРОТЕКТОРНЫХ ПЕПТИДОВ НА ЭКСПРЕССИЮ ВНУТРИЯДЕРНЫХ БЕЛКОВ, РЕГУЛИРУЮЩИХ БИОСИНТЕЗ РИБОСОМ В КУЛЬТУРЕ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК**

**Н.В. Левдик  
И.В. Князькин  
Н.Н. Севостьянова  
Н.С. Линькова**

*Санкт-Петербургский  
институт биорегуляции  
и геронтологии  
СЗО РАМН*

*e-mail: miauu@yandex.ru*

В работе исследуются механизмы влияния геропротекторных пептидов кардиогена и Т-32 на синтез внутриядерных белков в культуре опухолевых клеток. Исследуемые пептиды обладают разнонаправленным действием: кардиоген снижает экспрессию аргирофильных белков в области ядрышковых организаторов, тогда как пептид Т-32 стимулирует экспрессию указанных протеинов.

Ключевые слова: аргирофильные белки, ядрышковый организатор, опухоль, геропротекторные пептиды.

В настоящее время большое внимание уделяется исследованию пептидных биорегуляторов, названных цитомединами, многие из которых имеют ярко выраженные геропротекторные свойства [6]. Цитомедины представляют собой низкомолекулярные пептиды, которые регулируют активность клеток, участвуют в распространении сигналов между группами клеток и внутри клетки, регулируют гомеостаз продуцирующих их клеточных популяций, влияют на продукцию цитокинов клетками иммунной системы и осуществляют другие функции клеток [3-4].

Особенностью цитомединов является полифункциональность и высокая биологическая активность, при этом наибольший эффект цитомедины проявляют в тканях того органа, где они продуцируются [5].

Цитомедины выделены практически из всех клеток и тканей, в том числе из тимуса – центрального органа иммунитета и эпифиза, главного органа, регулирующего биологические ритмы и многие другие функции клеток. Из тимуса получены такие цитомедины (тимомометики), как тимопоэтин I и II, тимозин и др. [4]. Из эпифиза выделен эпифизин [5].

Благодаря детальному изучению аминокислотного состава цитомединов были сконструированы искусственные короткие пептиды. Одними из таких синтетических пептидов, проявивших выраженные геропротекторные свойства, являются пептид Т-32 и кардиоген (Н-Ala-Glu-Asp-Arg-OH) [5].

Несмотря на интенсивные исследования, механизм действия коротких пептидов на процессы, развивающиеся в клетках, изучен недостаточно. В частности, мало исследован механизм действия пептидов на образование структур, ответственных за синтез белка.

Как известно, синтез белка в клетке осуществляется на определенных внутриклеточных органоидах – рибосомах, которые определяют возможность его синтеза. Образование рибосом происходит в ядре в областях ядрышкового организатора (ОЯОР), представляющих собой у человека участки из 5 пар акроцентрических хромосом и структуры интерфазного ядрышка, где расположены кластеры рибосомных генов, кодирующие рибосомальные РНК (рРНК) [8-10]. Затем рибосомы поступают в цитоплазму, где располагаются на мембранах гранулярного эндоплазматического ретикула или свободно лежат в цитоплазме, иногда объединяясь в полирибосомы.

Ключевую роль в транскрипционной активности рибосомных генов, в образовании, созревании и транспорте рибосом в цитоплазму играют ассоциированные с ОЯОР аргирофильные белки. Они вовлекаются в процесс на основных этапах биогенеза рибосом, обеспечивающих, в конечном счете, синтез белков [10].

Наряду с регуляцией транскрипционной активности рибосомных генов образование, созревание и транспорт рибосом аргирофильных белков ОЯОР играет важную роль в регуляции клеточного цикла, определяя его продолжительность и скорость клеточной пролиферации [10]. Для пролиферирующих клеток характерна положительная корреляция между интенсивностью экспрессии аргирофильных белков и показателями кинетики клеточной популяции. Сообщается также об обратной зависимости количества аргирофильных белков ОЯОР и уровня дифференцировки клеток и прямой корреляции между экспрессией аргирофильных белков ОЯОР и степенью злокачественности различных опухолей человека [8, 9].

Целью данной работы явилось изучение влияния коротких геропротекторных пептидов – Т-32 и кардиогена на экспрессию аргирофильных белков ОЯОР в клетках экспериментальной опухоли – карциномы легких Льюис.

**Материал и методы.** Материалом для исследования послужили культивируемые клетки карциномы легких Льюис. Испытывали действие 3 доз пептида Т-32 и кардиогена: 2 нг/мл, 20 нг/мл и 200 нг/мл. Пептиды вводили в среду на 5 сутки культивирования. Исследование проводили через 1 час после введения пептида в культуру. Контролем служила культура клеток карциномы легких Льюис без введения пептидов.

Аргирофильные белки ОЯОР выявляли в клетках с помощью метода с нитратом серебра. Интенсивность экспрессии аргирофильных белков оценивали по количеству образующихся в результате реакции гранул серебра. Подсчет гранул проводили под иммерсией при увеличении 1000 (микроскоп Nikon Eclipse400) в 100 клетках. Подсчитывали среднее число гранул серебра на 1 ядро опухолевой клетки и определяли среднее количество гранул на ядро в каждой исследуемой группе. Статистическую обработку данных осуществляли с помощью критерия Стьюдента.

#### **Результаты исследования.**

**Контроль.** В условиях контроля в опухолевых клетках число гранул серебра в среднем составляло  $24,3 \pm 1,07$  на ядро. При этом установлены колебания числа гранул на ядро от 22,16 до 26,46.

**Действие пептида Т-32.** При добавлении в культуральную среду пептида Т-32 в опухолевых клетках отмечалось повышение содержания гранул серебра. При дозе пептида Т-32 2 нг/мл число гранул серебра в среднем составляло  $30,5 \pm 1,09$  на ядро (пределы колебаний от 28,32 до 32,68 гранул на ядро). По сравнению с контролем эти показатели были достоверно выше на 25,5% ( $p < 0,05$ ). При дозах пептида Т-32 20 нг/мл и 200 нг/мл содержание гранул серебра в эпителиальных клетках по-прежнему оставалось более высоким, чем в контроле. При дозе 20 нг/мл среднее число гранул серебра на ядро составляло  $31,7 \pm 1,17$  (пределы колебаний от 29,36 до 34,04 гранул на ядро), при дозе 200 нг/мл –  $32,7 \pm 0,96$  гранул на ядро (пределы колебаний от 30,78 до 34,62 гранулы на ядро). Эти показатели достоверно превышали контрольные значения соответственно на 30,4% и 34,5% ( $p < 0,001$ ). По мере возрастания доз пептида Т-32 отмечалось лишь незначительное повышение содержания гранул серебра в эпителиальных клетках, однако регистрируемые различия не были достоверными ( $p < 0,2$ ).

**Действие пептида кардиогена.** Действие кардиогена приводило к снижению содержания гранул серебра в ядрах эпителиальных клеток. Среднее число гранул серебра на ядро при дозе кардиогена 2 нг/мл составило  $19,8 \pm 1,05$  (пределы колебаний от 17,7 до 21,9). По сравнению с контролем среднее содержание гранул серебра в опухолевых клетках при этой дозе пептида было достоверно ниже на 18,5% ( $p < 0,01$ ). При дозе кардиогена 20 нг/мл и 200 нг/мл содержание гранул серебра в опухолевых клетках было сходным и в среднем составляло соответственно  $21,8 \pm 0,64$  и  $21,8 \pm 0,9$  гранул серебра на ядро (пределы колебаний 20,52 – 23,08 и 20,0 – 23,6 соответственно). Среднее число гранул серебра на ядро опухолевых клеток при дозе эпителиалона 20 нг/мл и 200 нг/мл было достоверно ниже, чем в контроле на 10,3% ( $p < 0,05$ ). Как и при действии пептида Т-32, достоверных различий в содержании гранул серебра в зависимости от доз кардиогена не было выявлено ( $p < 0,1$ ).

**Заключение.** Проведенное исследование позволило установить, что под действием пептида Т-32 в ядрах опухолевых клеток усиливается экспрессия аргирофильных белков ОЯОР, а кардиоген, напротив, снижает ее.

Обнаруженная при действии пептида Т-32 повышенная экспрессия аргирофильных белков в ядрах опухолевых клеток свидетельствует об активации ОЯОР в клетках и является отражением усиления транскрипционной активности рибосомальных генов, локализованных в ОЯОР, и стимуляции в опухолевых клетках образования, созревания, сборки и транспорта рибосом в цитоплазму.

Вероятно, действие пептида Т-32 создает в опухолевых клетках благоприятные условия для более активного синтеза белков, необходимых для адекватной функциональной деятельности клеток. Вместе с тем, повышенная экспрессия аргирофильных белков ОЯОР в опухолевых клетках, вызванная действием пептида Т-32, может также приводить к возрастанию их пролиферативного потенциала. Последнее подтверждается данными о положительной корреляции между интенсивностью экспрессии аргирофильных белков и пролиферативной активностью клеток, установленной при исследовании клеточных линий с разной скоростью пролиферации. Чем интенсивнее была экспрессия аргирофильных белков, тем выше становилась скорость пролиферации клеток. В быстро пролиферирующих клетках синтез рРНК и соответственно биогенез рибосом протекают в более короткий срок, что достигается включением большего числа транскрипционно активных копий рибосомальных генов, для образования которых в свою очередь требуется интенсивный синтез аргирофильных белков [10].

Установленное при действии кардиогена снижение экспрессии аргирофильных белков ОЯОР в ядрах опухолевых клеток может быть обусловлено подавлением транскрипции рибосомальных генов и снижением образования рРНК и рибосом, что может привести к изменению интенсивности синтеза белка в клетке.

Кардиоген в отличие от пептида Т-32 вызывает торможение процессов, связанных с биогенезом рибосом и может стимулировать дифференцировку опухолевых клеток и снижать их пролиферативную активность.

Полученные результаты позволяют сделать вывод о том, что пептид Т-32 усиливает экспрессию аргирофильных белков ОЯОР, стимулируя активность рибосомальных генов и образование рибосом в опухолевых клетках, тогда как кардиоген – экспрессию аргирофильных белков.

### Литература

1. Букаева, И.А. Значение аргирофильных белков области ядрышковых организаторов в разграничении доброкачественного и злокачественного роста эпителиальных опухолей щитовидной железы / Букаева И.А. (и др.) // Арх. патол. – 2001. – Т. 63. – №3. – С. 15-18.
2. Райхлин, Н.Т. Экспрессия аргирофильных белков областей ядрышкового организатора как показатель степени зрелости доброкачественных и злокачественных опухолей надпочечника / Н.Т. Райхлин // Арх. патол. – 2002. – Т. 64. – №3. – С. 26-30.
3. Хавинсон, В.Х. Пептидная регуляция генома и старение / Хавинсон В.Х. (и др.). – М., 2005. – 208 с.
4. Хавинсон, В.Х. Пептидная регуляция иммунобиологических механизмов старения / В.Х. Хавинсон, В.В. Малинин // Аллергология и иммунология. – 2008. – Т. 9. – № 4. – С. 443-444.
5. Хавинсон, В.Х. Пептидная регуляция старения / В.Х. Хавинсон. – СПб.: Наука, 2009. – 50 с.
6. Anisimov, V.N. Peptide bioregulation of aging: results and prospects / V.N. Anisimov, V.Kh. Khavinson // Biogerontology. – 2010. – Vol. 11. – P. 139-149.
7. Bukaeva, I. Diagnostic value of AgNORs in endocrine tumours: A study in a series of thyroid and adrenal cortical tumours / I. Bukaeva (and oth.)// Virchows Archiv. – 2001. – Vol. 439/ – N 3. – P. 256.
8. Derenzini, M. The prognostic value of the AgNOR parameter in human breast cancer depends on the pRb and p53 status / M. Derenzini (and oth.)//J. Clin. Pathol. – 2004. – Vol. 57. – N 7. – P. 755-761.
9. Raikhlin, N.T. Argyrophilic proteins of nucleolar organizers regions as markers of malignancy grade of anaplastic large-cell lymphoma and Hodgkin's lymphoma / N.T. Raikhlin (and oth.) // Arkh Patol. – 2004. – Vol. 66. – N 5. – P. 30-34.
10. Raikhlin, N.T. Argyrophilic proteins in the regions of nucleolar organizers are markers of cell proliferation rate / Raikhlin N.T. (and oth.) // Arkh Patol. – 2006. – Vol. 68. – N 3. – P. 47-51.



## **INFLUENCE OF GEROPROTECTIVE PEPTIDES ON EXPRESSION REGULATORY INTRANUCLEAR PROTEINS IN TUMOR CELL'S CULTURE**

**N.V. Levdik**

**I.V. Knyaskin**

**N.N. Sevostianova**

**N.S. Linkova**

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

*e-mail: miayy@yandex.ru*

There are investigated mechanisms of geroprotective peptide's influence on synthesis intranuclear proteins in tumor cells culture. Geroprotective peptides cardiogen and T-32 had various effects. Cardiogen increased expression of argyrophilic nucleolar organizers regions proteins and peptide T-32 decreased expression of these proteins.

Key words: argyrophilic proteins, nucleolar organizers regions, tumor, geroprotective peptides.