

ДИНАМИКА ЭКСПРЕССИИ ВАЗОАКТИВНОГО ИНТЕСТИНАЛЬНОГО ПОЛИПЕПТИДА В ТИМУСЕ ЧЕЛОВЕКА

УО «Белорусский государственный медицинский университет»

Методом непрямой иммуногистохимии исследовано распределение иммунореактивности к вазоактивному кишечному полипептиду (ВИП) в вилочковой железе плодов и новорожденных человека. Выявлены возрастные изменения иммунореактивности к ВИП, выражающиеся в снижении экспрессии нейропептида в тимусе новорожденных по сравнению с вилочковой железой плодов.

Ключевые слова: тимус человека, плод, новорожденный, вазоактивный кишечный полипептид, экспрессия.

A.V. Sokal, V.V. Roudenok

DYNAMIC EXPRESSION OF VASOACTIVE INTESTINAL POLYPEPTIDE IN THE THYMUS OF HUMAN FETUSES AND NEWBORNS

By the method of indirect immunohistochemistry was investigated the distribution of the immunoreactivity to vasoactive intestinal polypeptide (VIP) in the thymus of human fetuses and newborns. Age-dependent changes of VIP-IR in organ was revealed. The down-regulation of VIP-immunoreactivity was revealed in thymus of newborns.

Key words: human thymus, fetus, newborn, vasoactive intestinal polypeptide, expression.

Нейропептиды представляют собой значительную группу субстанций, влияющих на метаболизм и обнаруживаемых в регуляторных системах человека и млекопитающих животных. Обладая рядом признаков, характерных для нейромедиаторов, они отличаются от классических нейротрансмиттеров вегетативной нервной системы – ацетилхолина и норадреналина молекулярной массой, механизмами синтеза, депонирования, высвобождения, расщепления, а также длительностью физиологических эффектов в органах-мишенях. Показано, что часть лигандов, таких как пептидные гормоны, цитокины и их рецепторы, образуют целостный биохимический круг между иммунной и нейроэндокринной системами [9]. С помощью моно- и поликлональных антител к нейропептидам и ключевым ферментам их синтеза, на сегодняшний день установлено, что иммунокомпетентные клетки являются источником синтеза и экспрессии более 30 нейроэндокринных медиаторов; в том числе таких как: вазоактивный кишечный полипептид, пролактин, окситоцин, вазопрессин, проэнкефалин А, соматостатин, кальцитонин генеродственный пептид, опиоидные пептиды, нейропептид Y, субстанция P, кортикотропин-рилизинг фактор, гонадотропин-рилизинг гормон, глюкокортикоиды [9].

Вазоактивный кишечный полипептид (ВИП) впервые идентифицирован как кишечный пептид-вазодилататор, содержит 29 аминокислотных остатков и относится к глюкагонсекретинному семейству полипептидов [17,18]. Нейроны и нервные волокна, содержащие ВИП, найдены в центральной и периферической нервной системе [2,3,16]. Кроме того, вазоактивный кишечный полипептид широко представлен в сердечно-сосудистой, респираторной, иммунной, мочеполовой, эндокринной и пищеварительной системах человека и млекопитающих животных [11,22].

По мнению ряда авторов, вазоактивный кишечный полипептид, из всех известных к настоящему времени пептидов, которые участвуют в становлении как врожденного, так и приобретенного иммунитета, наиболее вовлечен в нейро-иммунную регуляцию [3,5,14,16,19,20]. В лимфоидных органах ВИП высвобождается из двух независимых источников: нервных волокон и собственно иммунокомпетентных клеток, образуя в результате

тесную функциональную связь между нервной и иммунной системами [3,16]. Лимфоциты не только экспрессируют мРНК вазоактивного кишечного полипептида и аккумулируют ВИП в цитоплазме, но и выделяют его в ответ на различные воспалительные и митогенные стимулы [3,12]. Как свидетельствует анализ литературы, рецепторы к ВИП обнаружены в широком ряду клеток иммунной системы, включая макрофаги, дендритные клетки, нейтрофилы, моноциты, натуральные киллеры, тучные клетки, эозинофилы, а также Т- и В-лимфоциты [2,3,8,12,15,16]. Осуществляя свое биологическое действие на клетки-мишени через ВИП-1 и ВИП-2 рецепторы, вазоактивный кишечный полипептид выступает в роли регулятора иммунного ответа [3,16]. Эксперименты *in vitro* и *in vivo* показали, что ВИП играет ключевую роль в сдвиге баланса Т-хелпер 1 / Т-хелпер 2 в пользу Т-хелпер 2 фенотипа [3,6,7,16,20,21]. Показано влияние вазоактивного кишечного полипептида на межклеточную миграцию макрофагов, а также стимуляцию адгезии и хемотаксиса [3,12]. Важно подчеркнуть, что различные популяции иммунокомпетентных клеток могут связывать разные подтипы ВИП рецепторов, а, следовательно, потенцировать различные реакции [3,16].

В исследованиях с использованием методов иммуногистохимии и проточной цитометрии, подтверждено наличие иммунореактивности к вазоактивному кишечному полипептиду как в центральных (тимус), так и периферических (селезенка, лимфатические узлы) лимфоидных органах [1,8,16]. По данным некоторых авторов ВИП-иммунореактивность определяется в стромальном и нервном компоненте вилочковой железы, главным образом, в нервных волокнах капсулы и междольковых септ [1,4, 16]. Описано свойство вазоактивного кишечного полипептида как эндогенного противовоспалительного агента. Установлено что ВИП может ингибировать синтез цитокинов (TNF- α , ИЛ-1 β , ИЛ-6, ИЛ-12); повышать продукцию ИЛ-10; ингибировать экспрессию и способствовать высвобождению провоспалительных хемокинов; поддерживать долгосрочное выживание Th2 клеток; снижать фагоцитарную активность макрофагов; подавлять синтез оксида азота [3,5,12,16]. Более того, полагают, что один из механизмов противовоспалительного действия вазоактивного ин-

тестинального полипептида может состоять в редукции активности антиген-презентирующих клеток (макрофагов, микроглии) [12,16].

Вместе с тем, как показал анализ литературы, подавляющее число исследований выполнено в условиях *in vitro* или на экспериментальных животных. Распределение ВИП-иммунореактивности в центральных и периферических органах иммунной системы человека, особенно в возрастном аспекте, исследовано недостаточно.

Цель исследования. Изучить экспрессию вазоактивного интестинального полипептида в тимусе плодов и новорожденных человека.

Материал и методы

Объект исследования: аутопсийный и биопсийный материал 14 тимусов плодов 24-27 недель и 11 тимусов новорожденных детей 1-4 суток.

Фиксация материала проводилась в универсальном растворе для иммуногистохимических исследований морфологического материала: 2% растворе Замбони, включающем параформальдегид, пикриновую кислоту, одно- и двухзамещенный фосфаты натрия (pH 7.4). После фиксации фрагменты тимуса последовательно промывались в 0.1M фосфатном буфере (pH 7.4), 50% этиловом спирте, 0.1 M фосфатном буфере (pH 7.4), 20% растворе сахарозы. В последнем растворе образцы ткани находились в течение 12 часов при температуре 4°C. Серийные срезы толщиной 8-10мкм были приготовлены из замороженных в 0,9% физиологическом растворе фрагментов тимуса с помощью автоматического замораживающего микротомы фирмы «Leica» при температуре -22°C, смонтированы на покрытых желатином (2% раствор) предметных стеклах и высушены при комнатной температуре (18-20°C) в течение 30 минут. Перед проведением иммуногистохимических реакций предметные стекла извлекались из холодильника и подвергались просушке в открытом помещении при температуре 18-20 °C в течение 30 минут. Затем срезы дважды промывались в 0.1 M фосфатном буфере (pH 7.4) в течение 20 минут, после чего на них наносился 10% раствор нормальной козьей сыворотки (Dakopatts; X907). Обработанные сывороткой препараты помещались в темную увлажненную камеру на 30 минут. После удаления сыворотки срезы обрабатывались сывороткой, содержащей поликлональные антитела к вазоактивному интестинальному полипептиду (ВИП, 1:400, VA 1285, Affinity). Извлеченные из темной увлажненной камеры по истечении срока инкубации препараты дважды по 10 минут промывались в кюветках с фосфатным буфером (pH 7.4).

После удаления избыточных вторичных антител на срезы

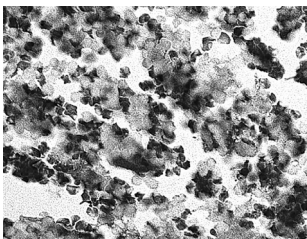


Рис. 1. Иммунореактивные к вазоактивному интестинальному полипептиду структуры в тимусе плода 27 недель. Кластеры ВИП-иммунопозитивных тимоцитов и эпителиальных клеток. Непрямой иммунопероксидазный метод. Ув.: 400.

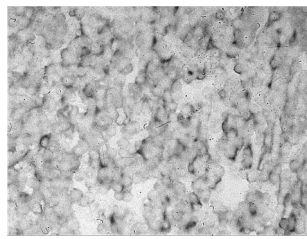


Рис. 2. Иммунореактивные к вазоактивному интестинальному полипептиду структуры в тимусе новорожденного. Положительные к ВИП тимоциты, эпителиальные клетки и нервные волокна. Непрямой иммунопероксидазный метод. Ув. 400.

наносился раствор, содержащий пероксидазно-антипероксидазный (ПАП) комплекс (Dakopatts Z113, разведение 1:100) и препараты оставлялись в камере для инкубации еще на 12 часов. В качестве хромогена для выявления продукта реакции применялся диаминобензидин (Amerham). После удаления сыворотки и двукратного промывания в фосфатном буфере (pH 7.4) срезы заключались в смесь глицерин/фосфатный буфер (3:1). Оценка результатов проводилась на универсальном фотомикроскопе Axiophot ("Zeiss", Германия). Интенсивность иммуногистохимической реакции определялась как слабая, средняя и сильная. В каждом случае анализировали 10 полей зрения при увеличении 400x. Определялся показатель экспрессии вазоактивного интестинального полипептида, который представлял собой отношение ВИП-иммунореактивных структур к общему количеству клеток в поле зрения, выраженный в процентах. Статистическую обработку полученных результатов проводили с применением пакета прикладных программ «STATISTICA» (Version 6-index, Statsoft Inc.).

Результаты и обсуждение

В вилочковой железе плодов человека 24-27 недельного возраста выявлены иммунореактивные к вазоактивному интестинальному полипептиду клеточные и волокнистые структуры. Показатель экспрессии вазоактивного интестинального полипептида в вилочковой железе плодов составлял $26,2 \pm 1,83$ %. Различной выраженности иммунореактивность к ВИП определялась в эпителиальных клетках, тимоцитах, дендритных клетках, а также в нервных волокнах. В клеточной популяции подавляющее большинство иммунореактивных к вазоактивному интестинальному полипептиду структур составляли клетки с небольшой величиной клеточного тела. Как правило, иммунореактивные к ВИП эпителиальные клетки формировали группы или располагались рядами (рис 1). Иногда они настолько близко прилегали друг к другу, что границы между клетками не определялись. Интенсивность иммуногистохимической реакции к ВИП варьировала. Наибольшую интенсивность реакции проявляли крупные и средние ВИП-ИР клетки. В различных регионах одного среза вилочковой железы количество иммунореактивных к вазоактивному интестинальному полипептиду структур также варьировало (рис 1). Между ВИП-иммунореактивными эпителиальными клетками и тимоцитами прослеживались тонкие извитые иммунореактивные к вазоактивному интестинальному полипептиду нервные волокна с точечными варикозными утолщениями. Не исключено, что эти ВИП-ИР нервные волокна являются отростками нейронов спинномозговых и вегетативных узлов.

Иммунореактивность к вазоактивному интестинальному полипептиду в тимусе новорожденных детей снижается. Показатель экспрессии ВИП составлял $15,4 \pm 1,16$ %, что достоверно ниже ($p < 0,01$), чем в вилочковой железе плодов ($26,2 \pm 1,83$ %). Большинство иммунореактивных к ВИП образований составляли эпителиальные клетки и нервные волокна. ВИП-ИР клетки также располагались во внутридольковых периваскулярных пространствах и в составе тимических телец (рис 2, 3). Появление ВИП-иммунореактивности в

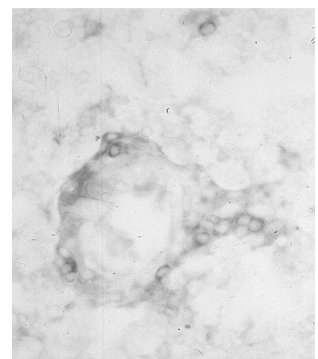


Рис. 3. Иммунореактивные к вазоактивному интестинальному полипептиду структуры в тимусе новорожденного. Экспрессия вазоактивного интестинального полипептида в эпителиальных клетках тимического тельца.

Непрямой иммунопероксидазный метод. Ув.: 400.

тельцах Гассалья может быть связано с эндокринной функцией тимуса у новорожденных в новых условиях их существования. Иммунореактивные к вазоактивному кишечному полипептиду нервные волокна определялись в капсуле, соединительнотканной строме, паренхиме и по ходу сосудов органа (рис 2).

Значительная экспрессия ВИП в тимусе человека в пренатальном онтогенезе является свидетельством его активного участия в процессах структурного и функционального созревания как сосудистого компонента вилочковой железы, так эпителиальных клеток и лимфоцитов, находящихся на разной стадии дифференцировки. Наличие в тимусе плодов и новорожденных ВИП-иммунореактивных клеток объясняется пролиферативным действием нейропептида, а также его метаболическими и трофическими эффектами [12]. Вазоактивный кишечный полипептид оказывает влияние на дифференцировку, созревание и пролиферацию тимоцитов, а также способен индуцировать апоптоз CD4+CD8+ субпопуляции. Снижение иммунореактивности к ВИП у новорожденных с одинаковой вероятностью может происходить как за счет уменьшения числа ВИП-ИР клеток вследствие их гибели, так и по причине снижения активности мРНК вазоактивного кишечного полипептида в оставшихся клетках. Важность экспрессии нейропептидов и вазоактивного кишечного полипептида в частности для развития органов иммунной системы человека трудно переоценить. Во-первых, ВИП обладает способностью стимулировать митотическую активность клеток, повышать выживание клеток в культуре и способствовать их селекции. Во-вторых, он может выступать в роли трофического фактора или изменять клеточный метаболизм, а также участвовать в формировании дефинитивного фенотипа, модифицируя синтез других биологически активных субстанций в развивающихся клетках [2,3,5,16]. Между тем, нельзя исключить и факт участия вазоактивного кишечного полипептида в регуляции сосудистой системы вилочковой железы. Как и кальцитонин ген-родственный пептид, ВИП является потенциальным вазодилататором [3,16]. Вызывая расширение сосудов, вазоактивный кишечный полипептид может опосредовано влиять на транспорт зрелых Т-клеток из тимуса в периферические лимфоидные органы.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о наличии иммунореактивности к вазоактивному кишечному полипептиду в тимусе плодов и новорожденных. Экспрессия ВИП является характерным признаком растущих и дифференцирующихся клеток тимуса человека. Вариабельность иммунореактивности к ВИП в вилочковой железе плодов и новорожденных может быть обусловлена гетерохронностью созревания структурных компонентов органа и их вовлечения в регуляцию иммунного ответа.

Литература

1. Bellinger, DL, Lorton D. VIP innervation of rat spleen, thymus and lymph nodes. *Peptides* 1997; 18:1139 – 1149
2. De la Fuente M, Delgado M. VIP modulation of immune cell functions. *Adv Neuroimmunol* 1996; 6:75 – 91.
3. Delgado, M, Pozo D. The Significance of Vasoactive Intestinal Peptide in Immunomodulation. *Pharmacol Rev* 2004; 56:249 – 290
4. Felten, DL, Felten SY. Noradrenergic and peptidergic innervation of lymphoid tissue. *J Immunol* 1985; 135:755 – 765.
5. Fraccaroli, L, Alfieri J. VIP modulates the pro-inflammatory maternal response, inducing tolerance to trophoblast cells. *Br J Pharmacol* 2009; 156(1):116-26.
6. Ganea, D, Rodríguez R. Vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide: players in innate and adaptive immunity. *Cell Mol Biol* 2003; 49:127 – 142.
7. Goetzl, EJ, Voice JK. Enhanced delayed-type hypersensitivity and diminished immediate type hypersensitivity in mice lacking the inducible VPAC(2) receptor for VIP. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98:13854 – 13859
8. Gomariz, RP, Martinez C. Immunology of VIP: a review and therapeutical perspectives. *Curr Pharm Design* 2001; 7:89 – 111.
9. Henning, RJ and Sawmiller DR Vasoactive intestinal peptide: cardiovascular effects. *Cardiovasc Res.* 2001; 49:27 – 37
10. Leceta, J, Martinez MC. Lymphoid cell subpopulations containing vasoactive intestinal peptide in rat. *Peptides* 1994; 15:791 – 797
11. Lundberg, P and Lerner UH. Expression and regulatory role of receptors for vasoactive intestinal peptide in bone cells. *Microsc Res. Tech.* 2002; 58:98 – 103.
12. Martinez, C, Delgado M et al. Vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide modulate endotoxin-induced IL-6 production by murine peritoneal macrophages. *J Leukoc Biol* 1998; 63:591 – 601.
13. Metwali, A, Blum AM. IL-4 inhibits vasoactive intestinal peptide production by macrophages. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2002; 283:115 – 121
14. Mignini, F, Streccioni V. Autonomic innervation of immune organs and neuroimmune modulation. *Auton Autacoid Pharmacol.* 2003; 23(1):1-25.
15. Peruzzi, M, Azzari C. A Inhibition of natural killer cell cytotoxicity and interferon gamma production by the envelope protein of HIV and prevention by vasoactive intestinal peptide. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2000; 16:1067 – 1073.
16. Pozo, D, Delgado M. The many faces of VIP in neuroimmunology: a cytokine rather a neuropeptide? *FASEB J* 2004; 18(12):1325-1334.
17. Said SI and Rosenberg RN Vasoactive intestinal polypeptide: abundant immunoreactivity in neuronal cell lines and normal nervous tissues. *Science (Wash DC)* 1976; 192:907 – 908
18. Said SI Vasoactive intestinal peptide. *J Endocrinol Invest* 1986; 9:191 – 200
19. Smalley, SG, Barrow PA. Immunomodulation of innate immune responses by vasoactive intestinal peptide (VIP): its therapeutic potential in inflammatory disease. *Clin Exp Immunol.* 2009;157(2):225-34.
20. Vetrini, F, Brunetti-Pierri N. Vasoactive intestinal peptide increases hepatic transduction and reduces innate immune response following administration of helper-dependent. *Ng PMol Ther.* 2010; 18(7):1339-45.
21. Voice, JK, Shen S. Enhanced delayed-type hypersensitivity and diminished immediate type hypersensitivity in mice lacking the inducible VPAC(2) receptor for VIP. *Proc Natl Acad Sci USA;* 2001; 98:13854 – 13859.
22. Yu XJ, Ren XH et al. Vasoactive intestinal peptide induces vascular endothelial growth factor production in human HaCaT keratinocytes via MAPK pathway. *Neuropeptides.* 2010; 44(5):407-11.
23. Zaitseva, M., Kawamura, et al. Stromal-derived factor 1 expression in the human thymus. *J. Immunol* 2002; 168, 2609 – 2617.