

А. В. Сокол

ИССЛЕДОВАНИЕ ИММУНОРЕАКТИВНОСТИ К КАЛЬЦИТОНИН ГЕН-РОДСТВЕННОМУ ПЕПТИДУ В ТИМУСЕ ЧЕЛОВЕКА

Белорусский государственный медицинский университет

Методом непрямой иммуногистохимии исследовано распределение иммунореактивности к кальцитонин ген-родственному пептиду (КГРП) в тимусе человека. Выявлены иммунореактивные к КГРП клеточные и нервноволокнистые структуры. Показатель экспрессии КГРП составлял $1,34 \pm 0,06\%$. Экспрессия кальцитонин ген-родственного пептида в клеточных структурах,

нервных волокнах и тельцах Гассаля свидетельствует о сохранении иммунной и нейроэндокринной функций тимуса на фоне его возрастной инволюции.

Ключевые слова: тимус человека, нейропептиды, кальцитонин ген-родственный пептид, иммунореактивность, регуляция.

A. V. Sokal

IMMUNOREACTIVITY TO CALCITONIN GENE-RELATED PEPTIDE IN THE HUMAN THYMUS.

Belarusian State Medical University

By the method of indirect immunohistochemistry was investigated the distribution of the immunoreactivity to calcitonin gene-related peptide (CGRP) in the human thymus. In the thymus we revealed immunoreactive to CGRP cellular and nerve fibrous structures. The index of expression of VIP was $1,34 \pm 0,06\%$. Expression of calcitonin gene-related peptide in the cell populations, nerve fibers and Hassall's corpuscles indicates persistent immune and neuroendocrine function of thymus against the background of age involution.

Key words: human thymus, neuropeptides, calcitonin gene-related peptide, immunoreactivity, regulation.

Среди многочисленных регуляторных субстанций, влияющих на метаболизм и обнаруживаемых в нервной, эндокринной и иммунной системах человека и млекопитающих животных, значительную роль играют нейропептиды. Обладая рядом признаков, характерных для нейромедиаторов, они отличаются от классических нейротрансмиттеров – ацетилхолина и норадреналина молекулярной массой, механизмами синтеза, депонирования, высвобождения, расщепления, а также длительностью физиологических эффектов в органах-мишенях. Пептидные гормоны и их рецепторы, образуют целостный биохимический круг между иммунной и нейроэндокринной системами [1]. С использованием моно- и поликлональных антител к нейропептидам и ферментам их синтеза, установлено, что иммунокомпетентные клетки являются источником синтеза и экспрессии более 30 нейроэндокринных медиаторов, включая кальцитонин ген-родственный пептид [2,3].

Кальцитонин ген-родственный пептид содержит 37 аминокислотных остатков и является котрансмиттером ацетилхолина. КГРП обладает широким спектром физиологической активности в дыхательной, сердечно-сосудистой, пищеварительной, мочеполовой, нервной, эндокринной и иммунной системах человека и млекопитающих животных [4]. Как показывают данные молекулярно-биологических, физиологических и фармакологических исследований, кальцитонин ген-родственный пептид выполняет многочисленные функции в регуляторных системах, потенцируя ряд метаболических и трофических эффектов в эффекторных клетках [5]. КГРП является сильным вазодилататором, вызывая не только атропин-резистентное расширение кровеносных сосудов, но и увеличение проницаемости сосудистой стенки [6];

Кальцитонин ген-родственный пептид может выполнять и иммуномодуляторные функции [7,8]. Отмечено наличие иммунореактивности к КГРП в тучных клетках, лимфоцитах тимуса, селезенки и лимфатических узлов [9]. Ряд работ свидетельствует о

наличии рецепторов к КГРП в популяциях Т- и В-лимфоцитов [10,11]. Кальцитонин ген-родственный пептид ингибирует продукцию γ -интерферона и интерлейкина-2, индуцируя в то же время секрецию интерлейкина-8 и интерлейкина-13 [12]. Показана антимикробная активность КГРП в отношении *Streptococcus mutans*, *Lactobacillus acidophilus*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Candida albicans* [14]. Кроме того, установлено влияние кальцитонин ген-родственного пептида на функции макрофагов и клеток Лангерганса, включая супрессию антиген-презентации и усиление фагоцитарной активности [7,12].

Между тем, значительное число исследований посвящено изучению распределения кальцитонин ген-родственного пептида в органах иммунной системы млекопитающих животных, а также в условиях *in vitro*. Данные об экспрессии КГРП в тимусе человека фрагментарны, а иногда и противоречивы, что свидетельствует об актуальности настоящего исследования.

Цель исследования.

Изучить распределение иммунореактивности к кальцитонин ген-родственному пептиду в тимусе человека.

Материал и методы.

Объект исследования: аутопсийный материал 34 тимусов человека 26 – 48 лет. В работе применялась разновидность непрямого иммуногистохимического метода – иммунофлуоресцентный метод исследования. Фиксация материала проводилась в универсальном растворе для иммуногистохимических исследований морфологического материала: 2% растворе Замбони, включающем параформальдегид, пикриновую кислоту, одно- и двухзамещенный фосфаты натрия (рН 7.4). После фиксации фрагменты тимуса последовательно промывались в 0.1М фосфатном буфере (рН 7.4), 50% этиловом спирте, 0.1 М фосфатном буфере (рН 7.4), 20% растворе сахарозы. В последнем растворе образцы ткани находились в течение 12 часов при температуре 4°C.

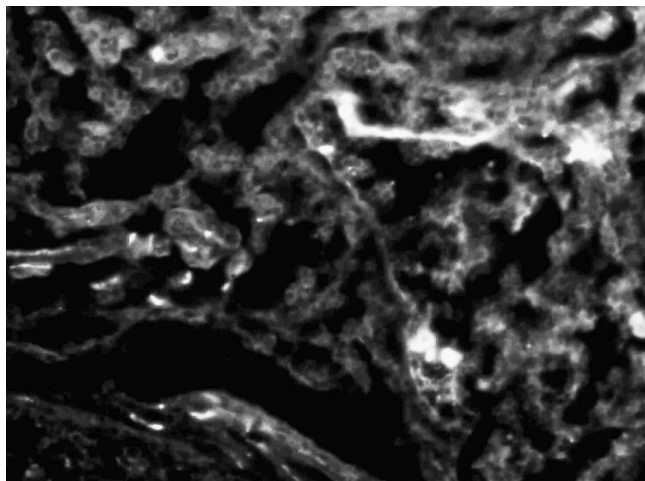


Рис. 1 – Иммунореактивные к кальцитонин ген-родственному пептиду клеточные структуры и нервные волокна в тимусе тимуса человека. Непрямой иммунофлуоресцентный метод. Ув. 200.

Серийные срезы толщиной 8-10 мкм 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 М 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 кальцитонин ген-родственному пептиду (КГРП, 1:200, ИНС 6012, Peninsula). 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 первичных антител срезы обрабатывались сывороткой, содержащей конъюгированные с флуорофорами: СуЗ (СуЗтм-GARlgG, 30254, Jackson) вторичные антитела в разведении 1:100, и затем помещались на 2 часа в темную увлажненную камеру. После удаления сыворотки и двукратного промывания в фосфатном буфере (pH 7.4) срезы заключались в смесь глицерин/фосфатный буфер (3:1) под покровные стекла. Оценка результатов проводилась на универсальном фотомикроскопе AxioPhot («Zeiss», Германия) с комбинациями фильтров для СуЗ индуцированной иммунофлуоресценции. Интенсивность иммуногистохимической реакции определялась как слабая, средняя и сильная. В каждом случае анализировали 10 полей зре-

ния при увеличении 400x. Определялся показатель экспрессии кальцитонин ген-родственного пептида, который представлял собой отношение КГРП - 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 тимусе человека выявлены иммунореактивные к кальцитонин ген-родственному пептиду клетки и нервные волокна. Показатель экспрессии КГРП составлял $1,34 \pm 0,06\%$. Различная интенсивность иммуногистохимической реакции к кальцитонин ген-родственному пептиду определялась в эпителиальных клетках, тельцах Гассалья и нервных волокнах (рис.1). Продукт иммуногистохимической реакции к КГРП в виде мелкодисперсных глыбок был равномерно распределен в клетках. Интенсивность иммунофлуоресценции варьировала – наиболее сильная ее степень, как правило, отмечалась в более крупных КГРП-ИР клетках и нервных волокнах. Немногочисленные иммунореактивные к кальцитонин ген-родственному пептиду клетки в паренхиме органа располагались одиночно; вблизи кровеносных сосудов или в составе телец Гассалья. Группы иммунореактивных к КГРП клеток, состоящие из двух-трех клеточных структур, обнаруживались редко. По ходу сосудов тимуса прослеживались иммунореактивные к кальцитонин ген-родственному пептиду нервные волокна. Извитые КГРП-ИР нервные волокна с небольшими варикозными утолщениями проходили в различных направлениях. Они определялись в периваскулярных пространствах тимуса и вблизи тимических телец. Иммунореактивные к кальцитонин ген-родственному пептиду нервные волокна и клетки наблюдались не на каждом срезе органа. В различных областях одного среза тимуса количество иммунореактивных к кальцитонин ген-родственному пептиду структур также варьировало.

Наши результаты по выявлению экспрессии кальцитонин-ген-родственного пептида в тимусе человека согласуются с данными других авторов, которые показали наличие иммунореактивности к нему в центральных и периферических органах иммунной системы млекопитающих животных [7, 8]. Вариации численности иммунореактивных к кальцитонин ген-родственному пептиду клеточных структур в тимусе у ряда млекопитающих объясняются видовыми особенностями

Сравнивая полученные результаты с данными нашего предыдущего исследования иммунореактивности к КГРП в тимусе плодов и новорожденных [16], можно заключить, что экспрессия кальцитонин ген-родственного пептида является характерным признаком развивающихся и дифференцирующихся клеток тимуса человека. Это заключение подтверждается достоверно ($P < 0,001$) большим

значением показателя экспрессии КГРП в тимусе плодов - $16,4 \pm 1,16\%$ и новорожденных - $8,4 \pm 0,86\%$ ($P < 0,001$), по сравнению с показателем экспрессии кальцитонин ген-родственного пептида в тимусе взрослых - $1,34 \pm 0,06\%$. Снижение иммунореактивности к КГРП в тимусе взрослого человека по сравнению с тимусом плодов и новорожденных может происходить за счет уменьшения числа КГРП-ИР клеток вследствие их гибели, а также вследствие снижения активности мРНК в оставшихся клетках. КГРП оказывает супрессивное действие на дифференцировку, созревание и пролиферацию тимоцитов. Опосредовано, влияя на синтез оксида азота (NO), кальцитонин генродственный пептид индуцирует апоптоз, предохраняя от поступления в кровоток аутореактивных иммунных клеток [5].

Иммунореактивность к кальцитонин ген-родственному пептиду в эпителиальных клетках и тельцах Гассалья свидетельствует о сохранении гормон-продуцирующей функции тимуса на фоне уменьшения функционально активной паренхимы органа вследствие возрастной инволюции. КГРП является сильным вазодилататором и вызывает не только атропин-резистентное расширение кровеносных сосудов, но и увеличение проницаемости сосудистой стенки. Наличие КГРП-ИР эпителиальных клеток, расположенных в периваскулярных пространствах тимуса, объясняется тем, что кальцитонин ген-родственный пептид, действуя как вазодилататор на гладкие мышечные клетки кровеносных сосудов, способен влиять на транспорт Т-клеток из тимуса в периферические лимфоидные органы [14]. Источником КГРП-иммунореактивных нервных волокон в исследованном тимусе человека могут являться отростки преганглионарных симпатических нейронов [4]. Не исключено, что некоторые иммунореактивные к кальцитонин ген-родственному пептиду нервные окончания принадлежат нейронам спинно-

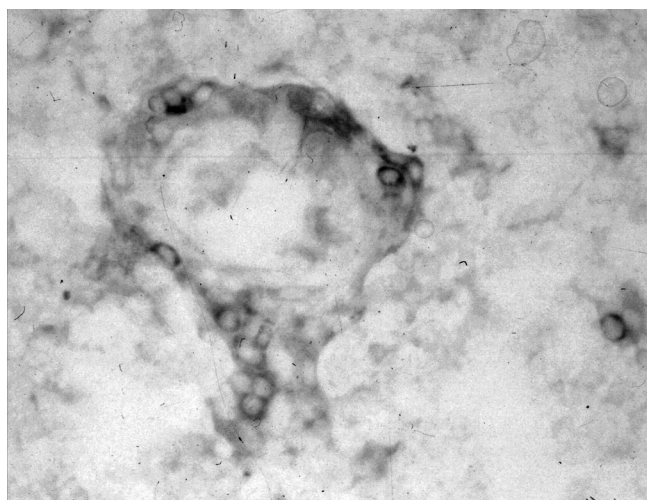


Рис. 2 – Иммунореактивные к кальцитонин ген-родственному пептиду структуры в тимусе новорожденного. Иммунопозитивные к КГРП нервные волокна и тимусо-эпителиальные клетки. Непрямой иммунопероксидазный метод. Ув. 400.

мозговых узлов. По данным литературы кальцитонин ген-родственный пептид определяется наряду с субстанцией Р в телах и отростках первичных и вторичных сенсорных нейронов [5]. О сосуществовании этих двух нейропептидов в нейронах спинномозговых и чувствительных ганглиев млекопитающих животных свидетельствует и одновременное исчезновение иммунореактивности к субстанции Р и КГРП в нервных волокнах воздухоносных путей и сердечно-сосудистой системы после введения экспериментальным животным капсаицина [4,5]. Принимая во внимание ингибиторные по отношению к эндопептидазе субстанции Р свойства кальцитонин ген родственного пептида, полагают, что функциональный смысл их сосуществования может состоять в усилении синаптической передачи, опосредуемой субстанцией Р. Действительно, КГРП потенцировал анальгетический эффект после интратекального введения субстанции Р белым крысам [5].

Более того, выделяясь из постганглионарных нервных окончаний, КГРП способствует высвобождению из тучных клеток и лейкоцитов простагландинов, цитокинов и биогенных аминов, что приводит к развитию асептического нейрогенного воспаления и активации ноцицепторов [4,12,14]. Учитывая, что КГРП является одним из ключевых нейротрансмиттеров ноцицепции [4], а также наличие рецепторов к кальцитонин ген-родственному пептиду в нервных и иммунокомпетентных клетках, не исключено, что иммунная система и тимус, в частности, участвуют в реакциях болевого стресса, обеспечивая двойной контроль функций эффекторных органов и тканей.

Сравнительный анализ полученных результатов с данными, касающимися возрастной динамики распределения другого «сосудорасширяющего» нейропептида - вазоактивного интестинального полипептида (ВИП) в тимусе человека [15] показал, что экспрессия КГРП и ВИП в тимусе человека в онтогенезе носит сходный «затухающий» характер. Однако степень участия двух регуляторных пептидов в процессах дифференцировки тимоцитов и межклеточных взаимодействиях различная, что подтверждается достоверно большим значением показателя экспрессии вазоактивного интестинального полипептида ($26,2 \pm 1,83\%$) по сравнению с показателем экспрессии кальцитонин ген-родственного пептида ($16,4 \pm 1,16\%$) в тимусе плодов, новорожденных ($15,4 \pm 1,16\%$ и $8,4 \pm 0,86\%$) и взрослых ($8,6 \pm 0,74\%$ и $1,34 \pm 0,06\%$) [15]. Хотя показатель экспрессии КГРП был значительно меньше по сравнению с показателем ВИП в тимусе взрослых, большая часть иммунореактивных к кальцитонин ген-родственному пептиду структур, так же как и к вазоактивному интестинальному полипептиду, была представлена эпителиальными клетками, тельцами Гассалья и нервными волокнами. Между тем в численном составе ВИП-ИР клеточные структуры превосходят популяцию иммунореактивных к КГРП нейронов, что

объясняется неодинаковым участием двух нейропептидов в обеспечении регуляторных функций и реализации своего индукторного и трофического влияния в иммунокомпетентных клетках.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют об иммунореактивности к кальцитонин ген-родственному пептиду в тимусе человека. Тимус человека в различные периоды онтогенеза характеризуется нейротрансмиттерной гетерогенностью, выражающейся в экспрессии клеточными и нервно-волоконными структурами органа наряду с другими нейротрансмиттерами кальцитонин ген-родственного пептида. Иммунореактивность к кальцитонин ген-родственному пептиду в тимусе определяется регуляторными свойствами нейропептида в определенный период онтогенеза человека и отличается в клетках паренхимы, микроокружения и нервных волокнах органа. Наличие экспрессии КГРП в клеточных структурах, нервных волокнах и тельцах Гассала тимуса у взрослых подтверждает иммунотропную и нейроэндокринную роль кальцитонин ген-родственного пептида в поддержании иммунитета в зрелом организме несмотря на возрастную инволюцию органа.

Литература

1. Savino, W, Dardenne M. Immunoneuroendocrine interactions. *Immunol Today*. – 1995. – 7:318–322.
2. Savino, W, Dardenne M. Neuroendocrine Control of Thymus Physiology. *Endocrine Reviews*. – 21(4): 412–443.
3. Singaram, C, Sengupta A, Stevens C, Spechler SJ, and Goyal RK. Localization of calcitonin gene-related peptide in human esophageal Langerhans cells. *Gastroenterology*. – 1991. – 100:560–563.
4. Micevych, P. E.; Kruger, L. The status of calcitonin gene-related peptide as an effector peptide. *Ann. NY Acad. Sci.* – 1992. – 657:379-396.
5. Van Rossum D, Hanisch UK, Quirion R: Neuroanatomical localization, pharmacological characterization and functions of CGRP, related peptides and their receptors. *Neurosci Biobehav Rev.* – 1997. – 21:649-678
6. Onuoha, GN, Alpar EK. Calcitonin gene-related peptide and other neuropeptides in the plasma of patients with soft tissue injury. *Life Sci.* – 1999. – 65(13):1351-8
7. Wang, X, Xing L, Xing Y, Tang Y, Han C. Identification and characterization of immunoreactive calcitonin gene-related peptide from lymphocytes of the rat. . – 1999. – 1;94(1-2):95-102.
8. Xing, LY, Xing YT, Tang YM, Guo JX, Wang X. Expression of calcitonin gene-related peptide (CGRP) mRNA in rat lymphocytes. *Sheng Li Xue Bao.* – 1998. – Aug; 50(4):423-30.
9. Wang, Z, Ji XR, Li JF, Gao JF, Liang GH. Expression of CGRP, ACTH and 5-HT in normal human lymph nodes. *Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi.* – 2003. – 19(1):95-6.
10. Mullins, MW, Ciallella J, Rangnekar V, McGillis JP. Characterization of a calcitonin gene-related peptide (CGRP) receptor on mouse bone marrow cells. *Regul Pept.* – 1993. – 19;49(1):65-72.
11. Umeda, Y.; Arisawa, M. Characterization of the calcitonin gene-related peptide receptor in mouse T-lymphocytes. *Neuropeptides.* – 1990. – 14:237.
12. Bulloch, K, McEwen BS, Diwa A, Radojcic T, Hausman J, Baird S. The role of calcitonin gene-related peptide in the mouse thymus revisited. *Ann N Y Acad Sci.* – 1994. – 25;741:129-36.
13. El Karim IA, Linden GJ, Orr DF, Lundy FT. Antimicrobial activity of neuropeptides against a range of micro-organisms from skin, oral, respiratory and gastrointestinal tract sites. *J Neuroimmunol.* – 2008 30;200(1-2):11-6. Epub 2008 Jul 7.
14. Kurz, B, von Gaudecker B, Kranz A, Krisch B, Mentlein R. Calcitonin gene-related peptide and its receptor in the thymus. *Peptides.* – 1995. – 16(8):1497-503.
15. Сокол, А. В., Руденок В. В. Динамика экспрессии вазоактивного интестинального полипептида в тимусе человека. *Военная медицина.* – 2012. – С 110-112.
16. Сокол, А. В., Руденок В. В. Распределение иммунореактивности к кальцитонин ген-родственному пептиду в тимусе плодов и новорожденных человека. *Медицинский журнал.* – 2012. – С. 84-86.