

ОБЩАЯ ПАТОЛОГИЯ И ПАТОЛОГИЧЕСКАЯ ФИЗИОЛОГИЯ

ИЗМЕНЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ ИНТЕРЛЕЙКИНА-2 В СТРУКТУРАХ ГИПОТАЛАМУСА КРЫС ПРИ ВВЕДЕНИИ ПЕПТИДОВ НА ФОНЕ СЛАБОГО СТРЕССА

С.В.Барабанова, З.Е.Артюхина, Т.Б.Казакова,
В.Х.Хавинсон*, В.В.Малинин*, Е.А.Корнева

*Отдел общей патологии и патофизиологии ГУ НИИ экспериментальной медицины РАМН (рук. — акад. РАМН проф. Е.А.Корнева), Санкт-Петербург; *Санкт-Петербургский институт биорегуляции и геронтологии СЗО РАМН*

Установлено изменение количества ИЛ-2-содержащих клеток в гипоталамусе крыс при разных вариантах введения пептидов вилона и эпиталона на фоне слабого стресса ("handling"). В этих условиях происходит уменьшение количества ИЛ-2-позитивных клеток в гипоталамических структурах через 24 ч после внутримышечного введения эпиталона и через 2 ч после интраназального введения пептидов. Адаптация животных к экспериментальным условиям предотвращала снижение количества ИЛ-2-позитивных клеток в супраоптическом ядре после интраназального введения эпиталона.

Ключевые слова: пептиды, вилон, эпиталон, интерлейкин-2-подобный белок, гипоталамус

При действии неблагоприятных факторов окружающей среды, а также при стрессе и старении происходят изменения в функциональном состоянии физиологических систем организма, в том числе и в иммунной системе.

Пептиды тимуса, эпифиза, коры головного мозга способствуют восстановлению нарушенных функций иммунной и эндокринной систем, обладают геропротекторной активностью [4,5,10,12]. Действие пептидов может проявляться на уровне регуляции экспрессии отдельных генов или продуктов их транскрипции. Установлено стимулирующее влияние вилона и эпиталона на экспрессию гена ИЛ-2 в спленоцитах мышей [2,6].

ИЛ-2 играет важную роль в регуляции иммунного ответа на антигены [1,3]. ИЛ-2, ИЛ-2 мРНК и рецепторы к ИЛ-2 присутствуют в тканях ЦНС [9]. В связи с тем что в головном мозге обнаружены также и специфические формы ИЛ-2, отличающиеся от ИЛ-2-белка, выявленного в лимфоцитах, при анализе ИЛ-2 в клет-

ках нервной системы принято употреблять термин "ИЛ-2-подобный белок".

Целью настоящей работы явилось изучение влияния вилона и эпиталона на содержание ИЛ-2-подобного белка в клетках гипоталамуса крыс в условиях слабого стресса ("handling") при разных сроках и способах введения пептидов.

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

Эксперименты проводили на крысах-самцах Вистар массой 180-200 г. Животные содержались при комнатной температуре с 12-часовым световым циклом и свободным доступом к воде и пище.

Введение вилона (Lys-Glu) и эпиталона (Ala-Glu-Asp-Gly) осуществляли путем однократного внутримышечного (2 мкг пептида в 200 мкл физиологического раствора на крысу) или однократного интраназального введения (по 10 нг в 1 мкл поочередно в каждую носовую полость). Необходимые экспериментальные манипуляции ("handling" — взятие в руки, помещение в фиксирующий домик) рассматривали как мягкое стрес-

Адрес для корреспонденции: havinson@gerontology.ru. Хавинсон В.Х.

сирующее воздействие. Контролем служили интактные животные, крысы, прошедшие адаптацию к рукам экспериментатора в течение 5 дней, и особи, которым вводили физиологический раствор в тех же объемах.

Через 24 ч после внутримышечной инъекции или через 2 ч после интраназального введения животных наркотизировали и проводили интракардиальную перфузию фосфатно-солевым буфером и фиксирующим раствором. Мозг извлекали через 1 ч и после предварительной криопротекции готовили срезы.

Использовали срезы головного мозга крысы, полученные на микротоме "Reichardt" с использованием замораживающей установки "Миконта-2" (-27°C), толщиной 20 мкм, помещенные в планшетные лунки. Обработку срезов и их фиксацию на стеклах вели по описанному ранее методу [3].

ИЛ-2-подобный белок выявляли непрямым иммунопероксидазным методом с поликлональными антителами против рИЛ-2 в разведении 1:20 ("Институт особо чистых биопрепаратов"). Использовали конъюгированные с пероксидазой

вторые антитела к IgG кролика в разведении 1:300 ("Sigma").

Подсчет клеток и определение оптической плотности проводили на 25-м уровне среза по атласу мозга крысы [13], используя систему "Иста-Видео-Тест". Количество ИЛ-2-позитивных клеток подсчитывали на площади 10 000 мкм².

Содержание ИЛ-2-подобного белка в клетках гипоталамических структур определяли, оценивая оптическую плотность ИЛ-2-позитивных клеток в процентах. За 100% был принят показатель оптической плотности фона.

Статистическую обработку результатов проводили с использованием *t* критерия Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Внутримышечное введение эпиталона в условиях слабого стресса приводило к снижению количества ИЛ-2-позитивных клеток в АНН, PVH и SO (переднем гипоталамическом поле, паравентрикулярном и супраоптическом ядрах гипоталамуса соответственно) через 24 ч по сравне-

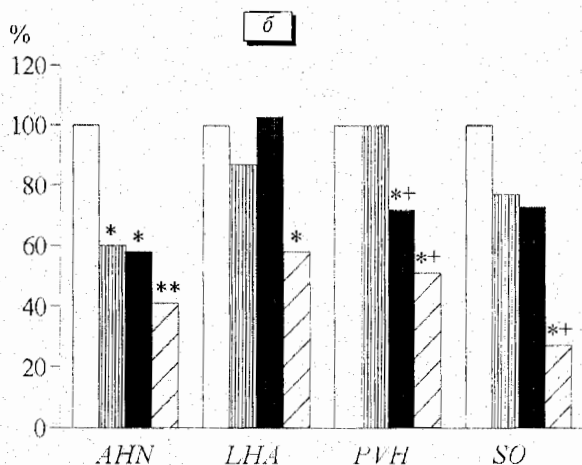
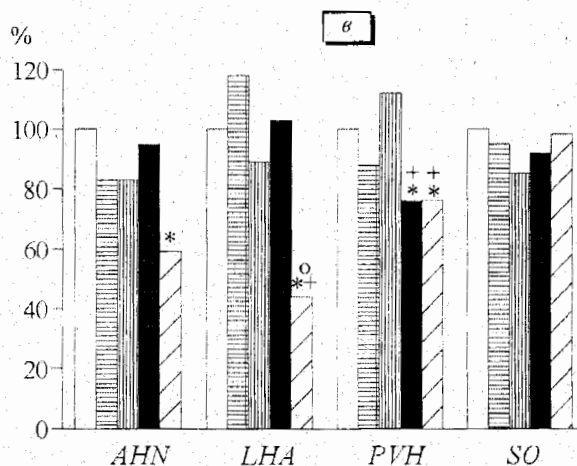
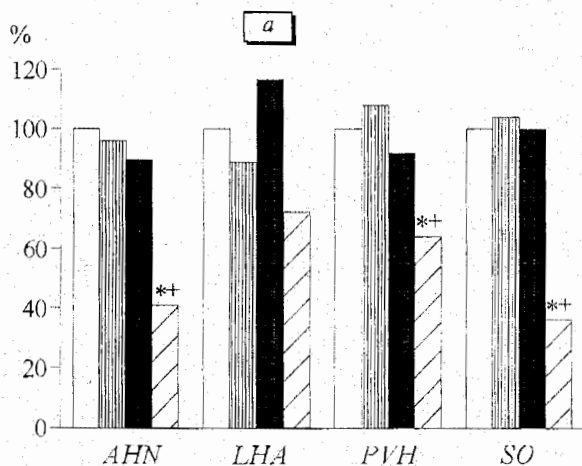


Рис. 1. Количество ИЛ-2-позитивных клеток в структурах гипоталамуса крыс через 24 ч после внутримышечного (а) и через 2 ч после интраназального (б, в) введения вилона и эпиталона неадаптированным (а, б) и адаптированным (в) животным.

За 100 % принято количество ИЛ-2-позитивных клеток у интактных животных на площади 10 000 мкм². Здесь и на рис. 2: светлые столбики — интактные животные, горизонтальная штриховка — адаптированные животные, вертикальная — физиологический раствор, темные столбики — вилон, косая штриховка — эпиталон. АНН — переднее гипоталамическое поле; LHA — латеральное гипоталамическое поле; PVH — паравентрикулярное ядро гипоталамуса; SO — супраоптическое ядро гипоталамуса.

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ по сравнению с интактными животными; + $p < 0.05$ по сравнению с реакцией на введение физиологического раствора; ° $p < 0.05$ по сравнению с адаптированными животными.

нию с их количеством у интактных животных и у животных, которым вводили физиологический раствор (рис. 1).

Полученные данные согласуются с результатами исследований транскриптома миокарда и головного мозга мыши, которые продемонстрировали модулирующее действие коротких пептидов на экспрессию генов [7,8].

При интраназальном введении вилон вызвал снижение количества ИЛ-2-позитивных клеток в PVH. Реакция на применение эпиталона выражалась в уменьшении количества ИЛ-2-позитивных клеток в PVH, SO и в тенденции к снижению количества этих клеток в LHA (латеральном гипоталамическом поле; рис. 1, а) через 2 ч после введения пептида.

Для того чтобы нивелировать стрессирующее действие экспериментальных манипуляций ("handling") животных адаптировали в течение 5 дней к экспериментальным условиям (взятие в руки, помещение на 1 мин в фиксирующий домик). Далее эксперименты проводили на адаптированных животных.

При интраназальном введении вилона у адаптированных к handling крыс, также как и в условиях handling, наблюдали уменьшение числа ИЛ-2-позитивных клеток в PVH. Введение эпиталона вызывало снижение количества ИЛ-2-позитивных клеток в PVH и LHA (рис. 1, б), но изменения данного показателя в SO у адаптированных к handling животных не наблюдали.

Анализ оптической плотности ИЛ-2-позитивных клеток в гипоталамических структурах, отражающий изменение внутриклеточного уровня содержания белка ИЛ-2, не выявил различий между этими показателями у животных контрольных и экспериментальных групп ни в одной из серий экспериментов, несмотря на тенденцию к снижению оптической плотности ИЛ-2-позитивных клеток при введении пептидов (рис. 2). Сопоставление данных о снижении количества ИЛ-2-позитивных клеток при действии пептидов и отсутствии изменений показателя внутриклеточного содержания ИЛ-2 позволяет сделать вывод о том, что уменьшение числа ИЛ-2-позитивных клеток отражает снижение уровня со-

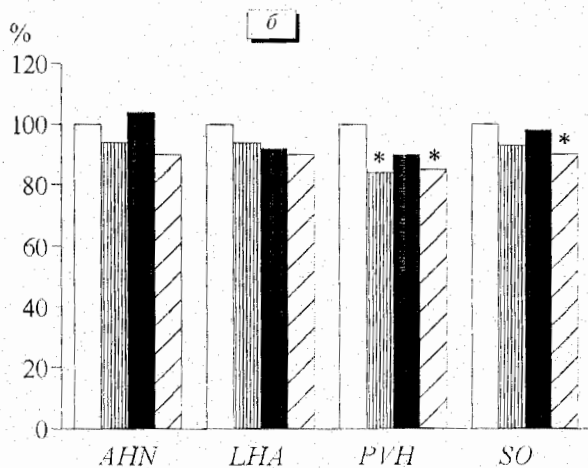
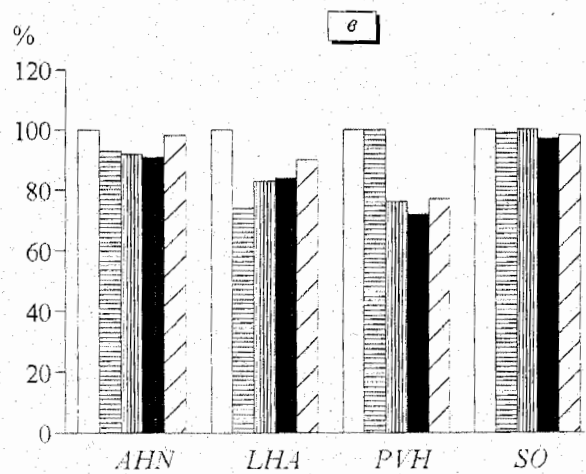
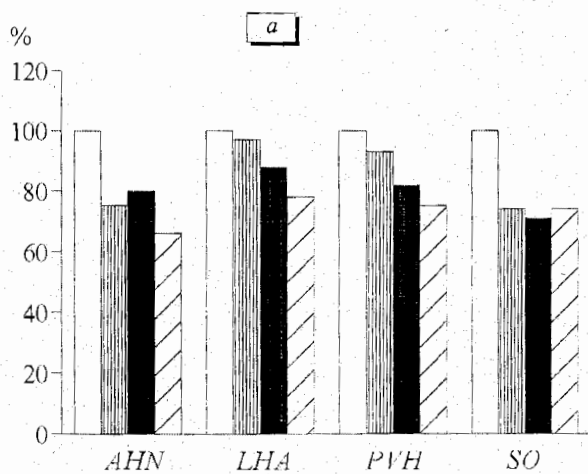


Рис. 2. Оптическая плотность ИЛ-2-позитивных клеток в структурах гипоталамуса крыс через 24 ч после внутримышечного (а) и 2 ч после интраназального (б, в) введения вилона и эпиталона неадаптированным (а, б) и адаптированным (в) животным. За 100 % принята оптическая плотность ИЛ-2-позитивных клеток у интактных животных.

держания белка ИЛ-2 в рассматриваемых гипоталамических структурах.

Таким образом, установлены модулирующие эффекты вилона и эпیتالона на уровень содержания ИЛ-2-подобного белка в структурах гипоталамуса крыс при слабом стрессе и адаптации к стрессу при разных способах введения исследуемых пептидов, выражающиеся в уменьшении количества ИЛ-2-позитивных клеток в исследованных структурах. Действие эпیتالона более выражено и проявляется через 24 ч после внутримышечного введения и через 2 ч после интраназального введения. Применение вилона приводит к уменьшению количества ИЛ-2-позитивных клеток в PVN только через 2 ч после интраназального введения. При адаптации животных к handling не изменяется количество ИЛ-2-позитивных клеток в SO при введении эпیتالона, тогда как в SO неадаптированных крыс наблюдали снижение количества ИЛ-2-позитивных клеток (рис. 1, б).

Данные литературы подтверждают предположение о том, что уровень реакции клеток SO на стресс может коррелировать с уровнем содержания ИЛ-2 в гипоталамических структурах. ИЛ-2 обладает стимулирующим влиянием на секрецию вазопрессина, образующегося в клетках SO, повышение секреции которого наблюдают также в ответ на стрессорное воздействие [9]. Показано также участие ИЛ-2 в активации гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой оси.

Введение эпیتالона на фоне handling усиливает реакцию клеток SO у неадаптированных животных и не оказывает влияния при адаптации к стрессу.

Уменьшение количества ИЛ-2-позитивных клеток после введения вилона и эпیتالона может быть объяснено не только ингибирующим влиянием пептидов на экспрессию ИЛ-2-белка, но также изменением баланса между его синтезом и потреблением.

При ряде патологических процессов происходит изменение содержания ИЛ-2 и рецепторов к ИЛ-2 в ЦНС и спинномозговой жидкости. При церебральном повреждении наблюдают повышение уровня концентрации ИЛ-2 в структурах головного мозга [9,11]. В таких ситуациях эффект снижения количества ИЛ-2-белка в структурах мозга может рассматриваться как позитивный. В связи с этим перспективными представляются исследования, в которых бы проводилась коррекция уровня содержания ИЛ-2 в головном мозге с помощью пептидов вилона и эпیتالона в условиях патологии.

Работа выполнена при поддержке РФФИ (грант № 03-04-49241).

ЛИТЕРАТУРА

1. Барабанова С.В., Головки О.И., Новикова Н.С. и др. // Нейрохимия. 1998. Т. 15, № 4. С. 380-387.
2. Казакова Т.Б., Барабанова С.В., Хавинсон В.Х. и др. // Бюл. exper. биол. 2002. Т. 133, № 6. С. 707-709.
3. Носов М.А., Барабанова С.В., Глушихина М.С. и др. // Рос. физиол. журн. 2001. Т. 87, № 3. С. 331-340.
4. Хавинсон В.Х., Анисимов В.Н., Заварзина Н.Ю. и др. // Бюл. exper. биол. 2000. Т. 130, № 7. С. 88-91.
5. Хавинсон В.Х., Кветной И.М., Ашмарин И.П. // Успехи соврем. биол. 2002. Т. 122, № 2. С. 190-203.
6. Хавинсон В.Х., Морозов В.Г., Малинин В.В. и др. // Бюл. exper. биол. 2000. Т. 130, № 9. С. 330-332.
7. Anisimov S.V., Khavinson V.Kh., Anisimov V.N. // Neuroendocrinol. Lett. 2004. Vol. 25. P. 87-93.
8. Anisimov S.V., Lakatta E.G., Bohler K.R. // Eur. J. Heart Fail. 2001. Vol. 3. P. 271-281.
9. Hanisch U.-K., Quirion R. // Brain Res. Rev. 1996. Vol. 21. P. 246-284.
10. Khavinson V.Kh., Goncharova N., Lapin B. // Neuroendocrinol. Lett. 2001. Vol. 22, N 4. P. 251-254.
11. Kuziel W.A., Greene W.C. // The cytokine handbook / Ed. A.Thomsen. L., 1991. P. 83-102.
12. Morozov V.G., Khavinson V.Kh. // Int. J. Immunopharmacol. 1997. Vol. 19, N 9-10. P. 501-505.
13. Swanson L.W. Brain maps: computer graphics files. Amsterdam, 1992.

Получено 23.12.05