

Н. С. Линькова¹, А. С. Катанугина¹, В. Х. Хавинсон^{1,2}

ЭКСПРЕССИЯ МАРКЕРОВ AIF И CGRP В ЭПИФИЗЕ И ТИМУСЕ ПРИ СТАРЕНИИ

¹ Санкт-Петербургский институт биорегуляции и геронтологии СЗО РАМН, 197110 Санкт-Петербург, пр. Динамо, 3; e-mail: ibg@gerontology.ru; ² Институт физиологии им. И. П. Павлова РАН, 199034 Санкт-Петербург, наб. Макарова, 6; e-mail: ibgu@medport.ru

Изучена экспрессия маркера митохондриального апоптоза AIF (apoptotic inducing factor) и нейрорептида CGRP (calcitonin gene related peptide) в аутопсийном материале эпифиза и тимуса людей старше 60 лет. Экспрессия AIF и CGRP была обнаружена в обоих органах, однако с возрастом она не изменялась, что свидетельствует о возможности сохранности сигнальных функций в органах нейроиммуноэндокринной системы при ее старении. В эпифизе выявлена корреляция между экспрессией AIF и CGRP, тогда как в тимусе такая зависимость отсутствует. Вероятно, в эпифизе, в отличие от тимуса, экспрессируется некоторая общая регуляторная молекула, которая связывает оба сигнальных пути.

Ключевые слова: эпифиз, тимус, сигнальные молекулы, старение

Возрастные изменения адаптивной способности организма характеризуются морфофункциональной перестройкой органов нейроиммуноэндокринной системы — тимуса и эпифиза. Для коррекции процессов старения необходимы сведения о фундаментальных механизмах возрастной инволюции как на органном и тканевом, так и на молекулярном уровнях [5]. В последние годы большое внимание уделяется поиску сигнальных молекул, играющих ключевую роль в морфофункциональной инволюции органов [8, 13, 14]. Нарушение экспрессии сигнальных молекул может служить индикатором клеточного старения [4]. Для изучения механизмов возрастной патологии интерес представляет фактор, индуцирующий апоптоз (AIF, apoptotic inducing factor), и ген-кальцитониновый пептид (CGRP, calcitonin gene related peptide).

Белок AIF является ключевым фактором, вводящим клетку в апоптоз по каспаз-независимому пути. С возрастом интенсивность апоптотических процессов в организме усиливается, что приводит к уменьшению пула клеток и снижению их способности поддерживать функциональную активность [6, 11]. Несвоевременный или избыточный апоптоз

вовлечен в патогенез ассоциированных с возрастом заболеваний, таких как болезни Альцгеймера и Паркинсона [19], сахарный диабет, инфаркт миокарда [17], в то время как неспособность делящихся клеток вступить в апоптоз способствует развитию рака [9, 10, 12, 18].

Пептид CGRP играет роль нейромедиатора при передаче сигнала от афферентных соматических нервных волокон к периферическим нервным волокнам и скелетным мышцам. Кроме того, CGRP является кардиопротектором и может препятствовать старению клеток-предшественников эндотелиоцитов у больных с гипертензией, а ускоренное старение эндотелия у этих больных может быть ассоциировано с сокращением экспрессии CGRP. Есть сведения об участии CGRP в осуществлении иммунного ответа. Белые отростчатые эпидермоциты (клетки Лангерганса) — эпителиальные дендритные клетки, способные к предъявлению антигенов для стимуляции клеточного иммунитета, ассоциированы с нервными клетками, экспрессирующими CGRP, который подавляет предъявление клетками Лангерганса антигенов T-хелперам первого типа (Th1). CGRP стимулирует предъявление клетками Лангерганса антигенов для клеточного ответа T-хелперов второго типа (Th2). Таким образом, контакт клеток Лангерганса с вырабатываемым нейронами CGRP *in situ* может способствовать формированию Th2-клеточного иммунитета [9]. CGRP оказывает митогенное воздействие и может влиять на работу различных типов клеток кожи. В культуре клеток CGRP усиливает экспрессию IL-1 α , IL-8 и TNF- α , а также способен усиливать секрецию фактора роста нейронов в кератиноцитах [9]. Изменение экспрессии CGRP, особенно в пожилом и старческом возрасте, может приводить к развитию аллергических реакций [15, 16], онкологических заболеваний [17], нарушению нервной передачи и другим патологи-

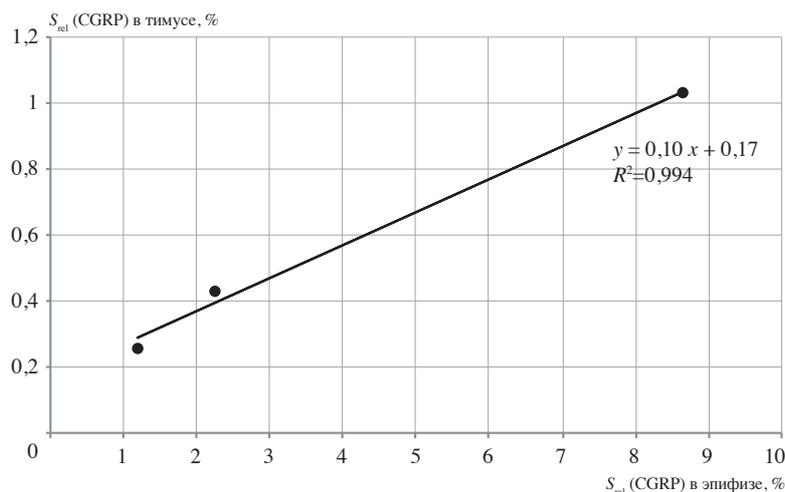


Рис. 1. Зависимость площади экспрессии CGRP в тимусе от площади экспрессии CGRP в эпифизе

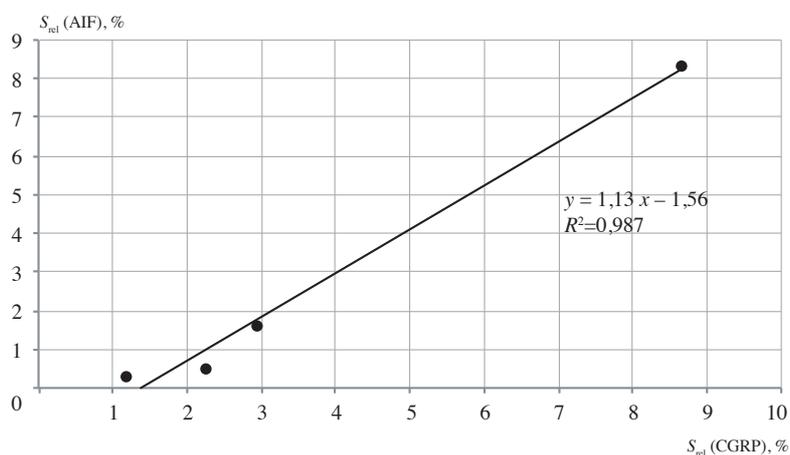


Рис. 2. Зависимость площади экспрессии AIF в эпифизе от площади экспрессии CGRP в эпифизе (мужчины)

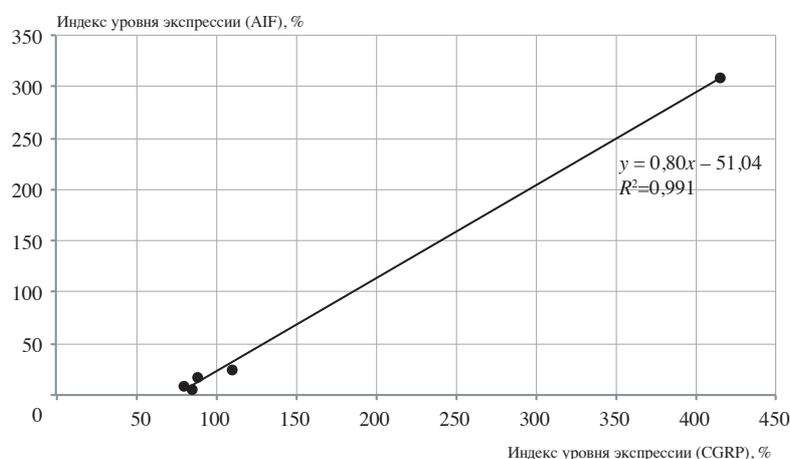


Рис. 3. Зависимость индекса уровня экспрессии AIF в эпифизе от индекса уровня экспрессии CGRP в эпифизе (мужчины)

ям [12]. Его экспрессия верифицирована в бронхоальвеолярном эпителии [15], в коже, поджелудочной железе [7], в нервной и других тканях. К наиболее изученным эффектам CGRP относят сосудорасширяющий, противовоспалительный и проангиогенный эффекты. Изменение экспрессии CGRP при старении организма может приводить к нарушению гомеостаза указанных систем и являться причиной возрастной патологии.

Данные многочисленных исследований позволяют сделать вывод о том, что AIF и CGRP являются ключевыми маркерами возрастных заболеваний в силу того, что эти сигнальные молекулы локализованы практически во всех тканях организма и имеют широкий спектр функциональной активности. Однако до сих пор не установлены возрастные особенности экспрессии AIF и CGRP в тканях тимуса и эпифиза. Целью исследования явилась оценка динамики изменения экспрессии AIF и CGRP в тимусе и эпифизе в разных возрастных группах, а также изучение взаимообусловленности их экспрессии [2, 3].

Материалы и методы

Аутопсийный материал эпифиза и тимуса был получен от 18 человек (8 мужчин и 10 женщин) от 60 до 100 лет. Согласно классификации ВОЗ, материал был получен от пациентов трех возрастных групп — пожилых ($n=6$), старческого возраста ($n=6$) и долгожителей ($n=6$). Фрагменты тимуса и эпифиза фиксировали в нейтральном растворе формалина ($pH=7$), обезвоживали и заливали в парафин по стандартной методике. Из парафиновых блоков на микротоме Leica 540 M готовили срезы толщиной 3–7 мкм и наносили их на стекла, обработанные поли-L-лизинном («Sigma»). Для обзорного изучения срезы окрашивали гематоксилином.

Верификацию экспрессии AIF и CGRP производили иммуногистохимическим методом с применением авидин-биотиновой системы визуализации

зации. Гибридизацию с использованием первичных моноклональных кроличьих антител к AIF (1:500, «Абсам») и CGRP (1:500, «Абсам») проводили при комнатной температуре в течение получаса. В качестве вторичных антител использовали биотинилированные антикроличьи иммуноглобулины из универсального набора («Dako»), с которыми инкубировали при комнатной температуре в течение получаса. Визуализацию окрасок проводили с применением комплекса авидина с биотинилированной пероксидазой (ABC-kit) с последующим проявлением пероксидазы хрена диаминобензидином («Dako»). Иммуногистохимическое изучение проводили на микроскопе Nikon E400. Для каждого препарата фотографировали от 3 до 10 полей зрения (ув. 400).

Для оценки интенсивности окрашивания были проведены морфометрические исследования с использованием системы компьютерного анализа микроскопических изображений Nikon и лицензионной программы «Морфология 5.0». При этом оценивали относительную площадь экспрессии (S_{rel}) и оптическую плотность (P). Относительную площадь экспрессии рассчитывали в процентах как отношение площади экспрессии к общей площади образца. Оптическую плотность вычисляли как отношение оптической плотности окрашенных участков в фоновой оптической плотности образца и выражали в процентах. Для оценки уровня экспрессии в целом был введен индекс уровня экспрессии (ИУЭ), который выражается как произведение относительной площади экспрессии и относительной оптической площади экспрессии и является безразмерной величиной.

Статистическую обработку результатов проводили с помощью программы SPSS 17.0 и Excel 2007. Для оценки значимости различий между тремя возрастными группами использовали однофакторный дисперсионный анализ с критерием Бонферрони [1]. Для ана-

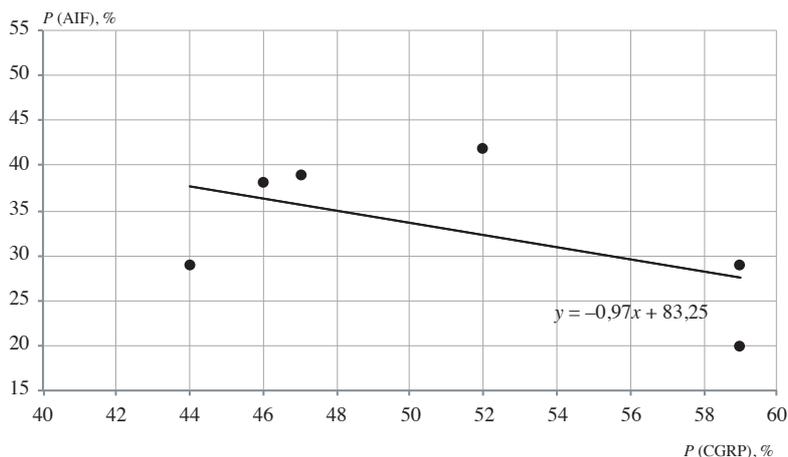


Рис. 4. Зависимость плотности экспрессии AIF от плотности экспрессии CGRP в эпифизе (женщины)

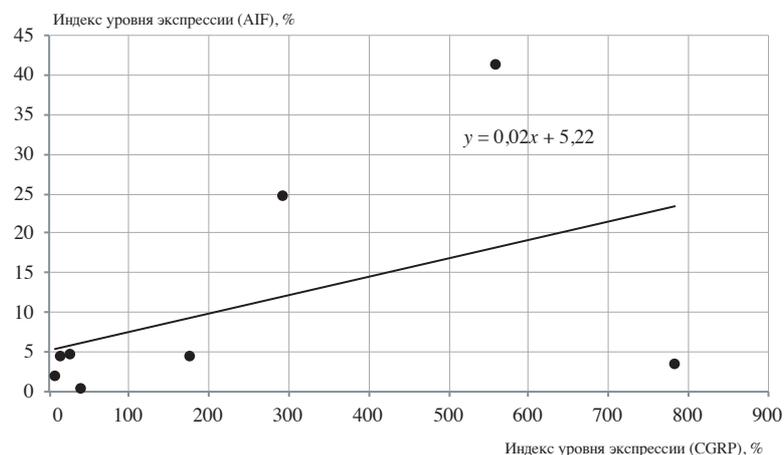


Рис. 5. Зависимость индекса уровня экспрессии AIF от индекса уровня экспрессии CGRP в тимусе (женщины)

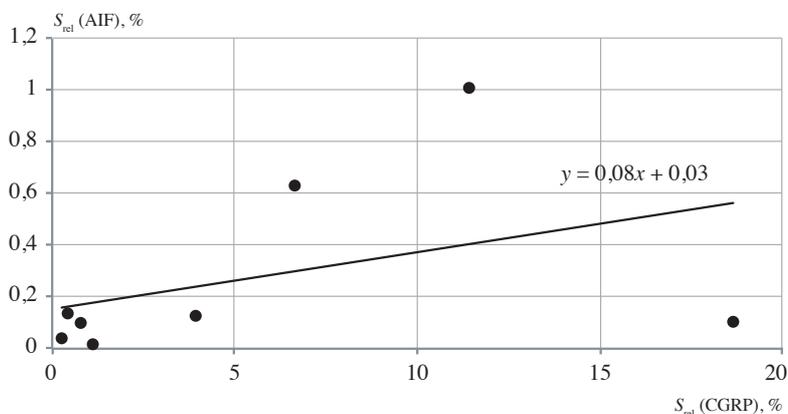


Рис. 6. Зависимость площади экспрессии AIF от площади экспрессии CGRP в тимусе (женщины)

лиза вида распределения параметров экспрессии в зависимости от возраста использовали регрессионный анализ. Проверку гипотез о корреляции между возрастом и уровнем экспрессии оценивали с помощью критерия корреляции Пирсона.

Результаты и обсуждение

В тимусе была выявлена тенденция к увеличению ИУЭ AIF по мере старения, что обусловлено увеличением площади экспрессии при постоянной оптической плотности. Анализ зависимости между параметрами экспрессии AIF и CGRP в тимусе при исключенном параметре возраста показал, что ИУЭ AIF коррелирует с ИУЭ CGRP в парах ($\rho < 0,05$), а с возрастом эта связь ослабляется и не зависит от пола.

В подгруппе мужчин площадь экспрессии CGRP в тимусе и эпифизе достоверно коррелировала в парах ($\rho < 0,05$, рис. 1). Кроме того, наблюдали статистически значимую зависимость между площадью экспрессии AIF и CGRP в эпифизе ($\rho < 0,01$, рис. 2), а также между индексами экспрессии этих сигнальных молекул ($\rho < 0,01$, рис. 3), но эта корреляция была сильнее, чем в тимусе.

В подгруппе женщин оптическая плотность экспрессии AIF и CGRP в эпифизе коррелировала отрицательно ($\rho < 0,05$, рис. 4). В тимусе ИУЭ и площадь экспрессии CGRP практически не менялись с возрастанием ИУЭ и площади экспрессии AIF, но наблюдали статистически достоверную корреляцию между ИУЭ ($\rho < 0,001$) и площадями экспрессии ($\rho < 0,001$, рис. 5, 6).

Выводы

В эпифизе выявлена достоверная корреляция между экспрессией AIF и CGRP, тогда как в тимусе подобная зависимость не обнаружена. Вероятно, этот факт свидетельствует о том, что в тимусе уровень экспрессии CGRP не влияет на интенсивность митохондриального апоптоза. Представляется возможным, что в эпифизе, в отличие от тимуса, экспрессируется некий общий посредник (общая регуляторная молекула), которая связывает оба сигнальных пути.

Уровень экспрессии CGRP в тимусе и эпифизе достоверно коррелировал, что служит подтверждением гипотезы о существовании общей регуляторной молекулы для CGRP и AIF в эпифизе и ее отсутствии в тимусе. Важно заметить, что экспрессия CGRP — свойство, присущее, как известно,

нервной ткани. CGRP, выделяемый нервными клетками, имеет митогенные свойства и способен индуцировать выброс прилегающими тканями фактора роста нейронов. Наличие отрицательной корреляции в эпифизе в оптической плотности экспрессии AIF и CGRP при отсутствии таковой в площади и индексе уровня экспрессии указывает на сбалансированность процессов апоптоза и пролиферации в нервной ткани. Экспрессия CGRP в тимусе и эпифизе свидетельствует о единстве органов нейроиммуноэндокринной системы.

Литература

1. Гланц С. Медико-биологическая статистика. М., Практика, 1999.
2. Линькова Н. С., Полякова В. О., Трофимов А. В. и др. Влияние пептидов эпифиза на функции тимуса при его старении // Успехи геронтол. 2010. Т. 23. № 4. С. 543–546.
3. Линькова Н. С., Полякова В. О., Трофимов А. В. и др. Пептидергическая регуляция дифференцировки, пролиферации и апоптоза тимоцитов при старении вилочковой железы // Бюл. экспер. биол. 2011. Т. 151. № 2. С. 203–206.
4. Полякова В. О., Линькова Н. С., Пичугин С. А. Динамика процессов апоптоза и пролиферации клеток пинеальной железы человека при старении // Бюл. экспер. биол. 2010. Т. 150. № 10. С. 443–445.
5. Хавинсон В. Х. Пептидная регуляция старения. СПб.: Наука, 2009.
6. Хавинсон В. Х., Кветной И. М. Пептидные биорегуляторы регулируют апоптоз // Бюл. экспер. биол. 2000. Т. 130. № 12. С. 657.
7. Al-Salam S., Hameed R., Parvez H. S., Adeghate E. Diabetes mellitus decreases the expression of calcitonin-gene related peptide, gamma-amino butyric acid and glutamic acid decarboxylase in human pancreatic islet cells // Neuroendocrinology Lett. 2009. Vol. 30. P. 506.
8. Anisimov V. N., Khavinson V. Kh. Peptide bioregulation of aging: results and prospects // Biogerontology. 2010. Vol. 11. P. 139–149.
9. Dallos A., Kiss M., Polyánka H. et al. Effects of the neuropeptides substance P, calcitonin gene-related peptide, vasoactive intestinal polypeptide and galanin on the production of nerve growth factor and inflammatory cytokines in cultured human keratinocytes // Neuropeptides. 2006. Vol. 40. P. 251–263.
10. Delettre C., Yuste V. J., Moubarak R. S. et al. AIFsh, a novel apoptosis-inducing factor (AIF) pro-apoptotic isoform with potential pathological relevance in human cancer // J. Biol. Chem. 2006. Vol. 281. P. 6413–6427.
11. Fabienne T. S., Sophie K., Amin A. et al. Deletion of the Mitochondrial Flavoprotein Apoptosis Inducing Factor (AIF) Induces β -Cell Apoptosis and Impairs β -Cell Mass // PLoS ONE. 2009. Vol. 4. P. 4394–4399.
12. Guo D., Kassiri Z., Basu R. et al. Loss of PI3K(γ) enhances cAMP-dependent MMP remodeling of the myocardial N-Cadherin adhesion complexes and extracellular matrix in response to early biomechanical stress // Circulat. Res. 2010. P. 137–141.
13. Khavinson V. Kh. Peptides and aging // Neuroendocrinology Lett. Special Issue, 2002.
14. Khavinson V. Kh., Malinin V. V. Gerontological aspects of genome peptide regulation. Basel (Switzerland): Karger AG, 2005.
15. Qi L., Saberi M., Zmuda E. et al. Adipocyte CREB promotes insulin resistance in obesity // Cell Metab. 2009. Vol. 9. P. 277–286.
16. Strecker T., Reeh P. W., Weyand M., Messlinger K. Release of calcitonin gene-related peptide from the isolated mouse heart:

methodological validation of a new model // *Neuropeptides*. 2006. Vol. 40. P. 107–113.

17. Suzuki K., Kobayashi Y., Morita T. Significance of serum calcitonin gene-related peptide levels in prostate cancer patients receiving hormonal therapy // *Urol. int.* 2009. Vol. 82. P. 291–295.

18. Yadava N., Nicholls D. G. Spare respiratory capacity rather than oxidative stress regulates glutamate excitotoxicity after partial

respiratory inhibition of mitochondrial complex I with rotenone // *J. Neurosci.* 2007. Vol. 27. P. 7310–7317.

19. Yu W., Mechawar N., Krantic S., Quirion R. Evidence for the involvement of apoptosis-inducing factor-mediated caspase-independent neuronal death in Alzheimer disease // *Amer. J. Path.* 2010. Vol. 176. P. 2209–2218.

Adv. geront. 2011. Vol. 24. № 4. P. 601–605

N. S. Linkova¹, A. S. Katanugina¹, V. Kh. Khavinson^{1,2}

EXPRESSION OF AIF AND CGRP MARKERS IN PINEAL GLAND AND THYMUS DURING AGING

¹ Saint-Petersburg Institute of Bioregulation and Gerontology, NWB of RAMS, 3 Dinamo pr., St. Petersburg 197110; e-mail: ibg@gerontology.ru; ² I. P. Pavlov Institute of Physiology of RAS, 6 Nab. Makarova, St. Petersburg 199034; e-mail: ibgu@medport.ru

We investigated the expression of AIF (apoptotic inducing factor) and CGRP (calcitonin gene related peptide) at autopsy material of pineal gland and thymus of people after 60 years old. The expression of AIF and CGRP was identified in both organs, but it did not change with age, which demonstrates the probable safety of functional activity of neuroimmunoendocrine system at aging. We found correlation between expression AIF and CGRP at pineal gland, but the correlation at thymus wasn't found. It is possible that pineal gland can express unidentified signal molecule controlling the expression of AIF and CGRP.

Key words: pineal gland, thymus, signal molecules, aging