

РАСПРЕДЕЛЕНИЕ ИММУНОРЕАКТИВНОСТИ К КАЛЬЦИТОНИН ГЕН-РОДСТВЕННОМУ ПЕПТИДУ В ТИМУСЕ ПЛОДОВ И НОВОРОЖДЕННЫХ ЧЕЛОВЕКА

УО «Белорусский государственный медицинский университет»

Методом непрямой иммуногистохимии исследовано распределение иммунореактивности к кальцитонин ген-родственному пептиду в вилочковой железе плодов и новорожденных. Выявлены возрастные изменения экспрессии КГРП, выражающиеся в снижении иммунореактивности к КГРП в тимусе новорожденных по сравнению с вилочковой железой плодов.

Ключевые слова: *тимус человека, плод, новорожденный, кальцитонин ген-родственный пептид, экспрессия.*

A. V. Sokal, V. V. Roudenok

DISTRIBUTION OF IMMUNOREACTIVITY TO CALCITONIN GENE-RELATED PEPTIDE IN THE THYMUS OF HUMAN FETUSES AND NEWBORNS

By the method of indirect immunohistochemistry was investigated the distribution of the immunoreactivity to calcitonin gene-related peptide in the thymus of human fetuses and newborns. Age-dependent changes of CGRP-IR in organ was revealed. The decrease of CGRP-immunoreactivity was marked in thymus of newborns.

Key words: *human thymus, fetus, newborn, calcitonin gene-related peptide, expression.*

Среди пептидных регуляторов, одну из ключевых позиций занимает кальцитонин ген-родственный пептид (КГРП). КГРП широко представлен в центральной и периферической нервной системе, а также в сердечно-сосудистой, респираторной, пищеварительной, мочеполовой системах человека и млекопитающих животных. [7,10,14]. 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 [12,13,18].

Вместе с тем кальцитонин ген-родственный пептид может быть определен и как иммуномодулятор, являясь общим лигандом нервной, эндокринной и иммунной систем [13,16,19]. В ряде работ отмечено наличие иммуно-

реактивности к КГРП в тучных клетках [2,17]; в лимфоцитах тимуса, селезенки и лимфатических узлов [11,16].

Как свидетельствует анализ литературы КГРП ингибирует продукцию γ -интерферона и интерлейкина-2 (ИЛ-2), индуцируя в то же время секрецию ИЛ-8 и ИЛ-13 [2]. Показана антимикробная активность КГРП в отношении *Streptococcus mutans*, *Lactobacillus acidophilus*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Candida albicans* [1,9]. Кроме того установлено влияние КГРП на функцию макрофагов и клеток Лангерганса, включая: супрессию антиген-презентации и усиление фагоцитарной активности [6,20]. По данным ряда авторов путем повышения уровня цитозольного кальция кальцитонин ген-родственный пептид модулирует активность синтазы оксида азота. [8].

Между тем, подавляющее большинство работ касает-

ся изучения распределения кальцитонин ген-родственного пептида в центральных и периферических органах иммунной системы птиц и млекопитающих животных, а также в условиях *in vitro*, в то время как данные об экспрессии КГРП в иммунной системе человека, в тимусе в частности отрывочны, а нередко и противоречивы, что свидетельствует об актуальности исследования распределения иммунореактивности к кальцитонин ген-родственному пептиду в тимусе в онтогенезе человека.

Цель исследования. Изучить экспрессию кальцитонин ген-родственного пептида 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 микротом 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. Затем препараты были помещены в холодильную камеру, где сохранялись при температуре -78°C. 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 кальцитонин ген-родственному пептиду (КГРП, 1:200, IHC 6012, Peninsula).

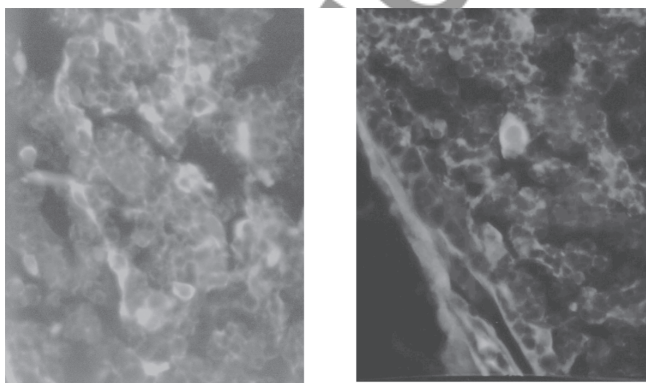


Рис.1 Иммунореактивность к кальцитонин ген-родственному пептиду в тимусе плода 25 недель (А) и новорожденного ребенка (Б). Непрямой иммунофлуоресцентный метод, x200.

Извлеченные из темной увлажненной камеры по истечении срока инкубации препараты дважды по 10 минут промывались в кюветах с фосфатным буфером (pH 7.4).

Далее срезы обрабатывались сыворотками, содержащими вторичные антитела, конъюгированные с флуорофорами: Cy3 (Cy3™-GARlgG, 30254, Jackson) в разведении 1:100, 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). Оценка результатов проводилась на универсальном фотомикроскопе Axiophot ("Zeiss", Германия) с комбинациями фильтров для Cy3 индуцированной иммунофлуоресценции. Интенсивность флуоресценции определялась как слабая, средняя и сильная. В каждом случае анализировали 10 полей зрения при увеличении 400x (Автандилов Г.Г., 1990). Определялся показатель экспрессии кальцитонин ген-родственного пептида, который представлял собой отношение КГРП-иммунореактивных структур к общему числу 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 недель выявлены иммунореактивные к кальцитонин ген-родственному пептиду клеточные и волокнистые элементы. Показатель экспрессии КГРП составлял $16,4 \pm 1,16\%$. Экспрессия кальцитонин ген-родственного пептида обнаруживалась в эпителиальных клетках, тимоцитах, дендритных клетках, макрофагах, а также нервных волокнах (рис. 1а). В клеточной популяции подавляющее большинство иммунореактивных к кальцитонин ген-родственному пептиду структур составляли клетки с небольшой величиной клеточного тела и слабой или средней степенью экспрессии. Как правило, иммунореактивные к КГРП клетки формировали небольшие группы, состоящие из клеток одной величины или различных размеров. Нередко они располагались настолько близко друг к другу, что границы между ними не определялись. Между КГРП-иммунореактивными эпителиальными клетками и тимоцитами прослеживались тонкие извитые иммунопозитивные к кальцитонин ген-родственному пептиду нервные волокна с точечными варикозными утолщениями. В различных полях зрения одного среза вилочковой железы количество иммунореактивных к кальцитонин ген-родственному пептиду структур также варьировало.

В тимусе новорожденных детей по сравнению с вилочковой железой плодов количество КГРП-ИР структур уменьшалось. Большинство иммунореактивных к КГРП образований составляли эпителиальные клетки и нервные волокна. Отмечалась средняя степень экспрессии кальцитонин ген-родственного пептида в эпителиальных клетках телец Гассала. Проникая в ткань вилочковой железы в области капсулы, положительные к кальцитонин ген-родственному пептиду нервные волокна распространялись по ходу сосудов органа, формируя периваскулярные сплетения. Не исключено, что КГРП-ИР нервные волокна афферентного происхождения или являются отростками нейронов узлов симпатического ствола. Наличие большего числа КГРП-ИР клеток, расположенных во внутридольковых периваскулярных пространствах, объясняется тем, что кальцитонин ген-родственный пептид, действуя как вазодилатор на гладкие мышечные клетки кровеносных сосудов, способен влиять на транспорт зре-

■ Оригинальные научные публикации

ных Т-клеток из тимуса в периферические лимфоидные органы [2,3,4,5,11,15].

Иммунореактивность к КГРП в тимусе человека к моменту рождения ребенка снижается. Показатель экспрессии кальцитонин ген-родственного пептида в вилочковой железе новорожденных детей составлял $8,4 \pm 0,86\%$, что достоверно ниже ($p < 0,01$), чем в тимусе плодов ($16,4 \pm 1,16\%$). Значительная экспрессия КГРП в тимусе человека в пренатальном онтогенезе является свидетельством его активного участия в процессах структурного и функционального созревания как стромального и сосудистого компонентов вилочковой железы, так и тимоцитов находящихся на разной стадии дифференцировки. Присутствие в тимусе плодов и новорожденных КГРП-иммунореактивных клеток связано с пролиферативным действием нейропептида на клетки, а также его метаболическими и трофическими эффектами [12]. Кальцитонин ген-родственный пептид оказывает влияние на дифференцировку, созревание и пролиферацию тимоцитов, а также способен индуцировать апоптоз CD4+CD8+ популяции. Снижение иммунореактивности к КГРП к моменту рождения ребенка с одинаковой вероятностью может происходить как за счет уменьшения числа КГРП-ИР клеток вследствие их гибели, так и по причине снижения активности мРНК кальцитонин ген-родственного пептида в оставшихся клетках.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о наличии иммунореактивности к кальцитонин ген-родственному пептиду в тимусе плодов и новорожденных детей. Экспрессия КГРП является характерным признаком растущих и дифференцирующихся клеток тимуса человека. Вариабельность иммунореактивности к КГРП в вилочковой железе плодов и новорожденных может быть обусловлена гетерохронностью созревания структурных компонентов органа и их вовлечения в регуляцию иммунного ответа.

Литература

1. Antunez, C, Torres MJ, Lopez S, Rodriguez-Pena R, Blanca M Calcitonin gene-related peptide modulates interleukin-13 in circulating cutaneous lymphocyte-associated antigen-positive T cells in patients with atopic dermatitis. // *Br J Dermatol*. 2009 Sep;161(3):547 – 53.
2. 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 Nov 25;741:129 – 36.
3. Carucci, JA, Ignatius R, Wei Y, Cypess AM, Schaer DA Calcitonin gene-related peptide decreases expression of HLA-DR and CD86 by human dendritic cells and dampens dendritic cell-driven T cell-proliferative responses

via the type I calcitonin gene-related peptide receptor. *J Immunol* 2000, 164:3494 – 3499.

4. Champion, HC, Bivalacqua TJ, Pierce RL, Murphy WA Responses to human CGRP, ADM, and PAMP in human thymic arteries. // *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2003 Feb;284(2):R531-7.

5. Dakhama, A, Balhorn A, Taube C, Alvarez AG Calcitonin gene-related peptide inhibits antigen-specific T-cell activation and subsequent development of a primary allergic immune response. // *J Allergy Clin Immunol* 2003, 111:S290.

6. Ichinose, M, Sawada M Enhancement of phagocytosis by calcitonin gene-related peptide (CGRP) in cultured mouse peritoneal macrophages. // *J. Peptides*. 1996;17(8):1405 – 14.

7. Gibson, S.J., Polak, J.M., Bloom, S.T., Sabate, I.M. Calcitonin gene-related peptide immunoreactivity in human and eight other species. // *1984.- J. Neurosci*. 4, 3101 – 3111.

8. Golden, SC, Shalita AR, Lee WL. Neuropeptide (calcitonin gene-related peptide) induction of nitric oxide in human keratinocytes in vitro. // *J. Invest Dermatol*. 2006 Sep;126(9):1994 – 2001

9. El Karim IA, Linden GJ, Orr DF, Lundy FT. // *J Neuroimmunol*. Antimicrobial activity of neuropeptides against a range of micro-organisms from skin, oral, respiratory and gastrointestinal tract sites. // 2008 Aug 30;200(1 – 2):11 – 6.

10. Kranz A, Kendall MD, von Gaudecker B: Studies on rat and human thymus to demonstrate immunoreactivity of calcitonin gene-related peptide, tyrosine hydroxylase and neuropeptide Y. // *J Anat* 1997, 191:441 – 450.

11. Kurz B, von Gaudecker B, Kranz A, Krisch B. Calcitonin gene-related peptide and its receptor in the thymus. // *Peptides* 1995;16(8):1497-503.

12. Micevych, P. E.; Kruger, L. The status of calcitonin gene-related peptide as an effector peptide. // *Ann. NY Acad. Sci*. 657:379 – 396: 1992.

13. Mignini F, Streccioni V, Amenta F. Franco-Cereceda et al. Autonomic innervation of immune organs and neuroimmune modulation. // *Auton Autacoid Pharmacol*. 2003 Feb;23(1):1 – 25.

14. Millet I, Phillips RJ, Sherwin RS, Ghosh S. Inhibition of NF-kappaB activity and nhancement of apoptosis by the neuropeptide calcitonin gene-related peptide. // 2000 May 19;275(20):15114 – 21.

15. Sakuta, H, Inaba K, Muramatsu S Calcitonin gene-related peptide enhances apoptosis of thymocytes. // *J Neuroimmunol*. 1996 Jul;67(2):103 – 9.

16. 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 Jan;19(1):95 – 6.

17. Weihe, E, Muller S, Fink T, Zentel HJ Tachykinins, calcitonin gene-related peptide and neuropeptide Y in nerves of the mammalian thymus: interactions with mast cells in autonomic and sensory neuroimmunomodulation // *Neurosci Lett*. 1989 May 22;100(1-3):77 – 82.

18. Xian, Wang, Liyu Xing, Yutong Xing, Yueming Tang Identification and characterization of immunoreactive calcitonin gene-related peptide from lymphocytes of the rat // *Chide Han Journal of Neuroimmunology* 94 1999 95 – 102

19. Xing, L, Guo J, Wang X. Induction and expression of beta-calcitonin gene-related peptide in rat T lymphocytes and its significance. // *J Immunol*. 2000 Oct 15;165(8):4359 – 66

20. Yaraee, R, Ebtekar M, Ahmadiani A, Sabahi F Effect of neuropeptides (SP and CGRP) on antigen presentation by macrophages. // *Immunopharmacol Immunotoxicol*. 2005; 27(3):395 – 404.

Поступила 24.02.2012 г.