

КОМПЕНСАТОРНОЕ ДЕЙСТВИЕ ПЕПТИДОВ ЭПИФИЗА НА ОРГАНЫ ИММУННОЙ И ЭНДОКРИННОЙ СИСТЕМ У ЭПИФИЗЭКТОМИРОВАННЫХ КРЫС

Н.С. Линькова
В.Х. Хавинсон
А.В. Трофимов
А.В. Дудков

Санкт-Петербургский институт биорегуляции и геронтологии СЗО РАМН

e-mail: miayuy@yandex.ru

Показано, что при эпифизэктомии количество иммунных клеток в селезенке и С-клеток в щитовидной железе возрастает, что свидетельствует о нарушении регуляторных взаимодействий в нейроиммуноэндокринной системе. Пептидный комплекс эпифиза-гипофизарной области эпифиза и синтетический пептид эпифиза восстанавливают баланс апоптоза и пролиферации в тканях селезенки и щитовидной железы и нормализуют гормональную активность последней. Полученные данные свидетельствуют о компенсаторной функции пептидов эпифиза в регуляции эндокринной и иммунной систем организма.

Ключевые слова: пептиды эпифиза, эпифизэктомия, селезенка, щитовидная железа.

Эпифиз является интегральной частью нейроиммуноэндокринной системы, осуществляющей пептидную и гормональную регуляцию органов нервной, эндокринной и иммунной систем. Известно, что эпифиз играет важную роль в поддержании функциональной активности тимуса при его возрастной инволюции, а также регуляции функций поджелудочной железы и циркадианных ритмов [2, 4]. Дисфункция эпифиза, в ряде случаев наблюдаемая у лиц пожилого возраста, приводит к нарушению гомеостаза на уровне организма, основной причиной которой является нарушение активности иммунной и эндокринной систем [3, 5, 7]. В связи с этим представляется важным разработка и изучение механизма действия пептидных препаратов эпифиза, способствующих восстановлению нейроиммуноэндокринных взаимодействий при старении.

Показано, что полипептидный препарат эпифизамина, выделенный из эпифиза-гипофизарной области головного мозга телят, является эффективным средством в лечении гормонозависимых опухолей, дисгормональной миокардиодистрофии и последствий стрессорных воздействий на организм [5-7, 9]. На основе эпифизамина в Санкт-Петербургском институте биорегуляции и геронтологии СЗО РАМН был синтезирован короткий тетрапептид эпифизина, обладающий всеми эффектами эпифизамина.

В связи с этим целью исследования явилось изучение компенсаторного влияния эпифизамина и эпифизина на селезенку и щитовидную железу у эпифизэктомированных крыс.

Методика. Работа выполнена на самцах – крысах Вистар, имеющих массу тела 130-140 г. Животные содержались в обычных условиях вивария при дневном освещении и сбалансированном рационе питания в осенне-зимний период времени.

Все животные были разделены на 4 группы. В 1 (контрольную) группу (n=5) вошли интактные крысы. 2 группа (n=5) была представлена животными, у которых был удален эпифиз, а через 3 недели после операции им подкожно вводили физиологический раствор по 0,5 мл в течение последующих 10 дней. Крысам 3 (n=5) и 4 группы (n=5) после эпифизэктомии вместо физиологического раствора соответственно вводили эпифизин или эпифизамин в дозе 0,5 мкг.

Забой животных и выделение селезенки и щитовидной железы проводили под нембуталовым наркозом (50 мг/кг) через 3 сут после окончания введения препаратов.

Кусочки селезенки и щитовидной железы фиксировали в жидкости Буэна, обезвоживали и заливали в парафин. Парафиновые срезы толщиной 7 мкм помещали на предметные стекла, покрытые пленкой из поли-L-лизина (Sigma). Гистологическое изучение образцов селезенки и щитовидной железы, окрашенных гематоксилин-эозином, проводили на микроскопе Jenamed-2 (Zeiss).

Среднюю площадь лимфатических фолликулов селезенки определяли на уровне максимальных диаметров фолликулов, определенных по серийным срезам. Тесто-

вая площадь для изучения количественной плотности митозов и апоптоза лимфоцитов в реактивных центрах фолликулов селезенки включала не менее 1000 ядер клеток, окрашенных гематоксилином. Для оценки соотношения митотической активности и индуцированной гибели лимфоцитов использовали индекс пролиферативной активности клеток, равный отношению количественной плотности митозов к числу вступивших в апоптоз клеток.

Для анализа С-клеток в щитовидной железе использовали показатель объемной плотности клеток, их количества в 1 мм² ткани железы и оптическую плотность кальцитонин-положительных структур, выявляемых методом иммуногистохимии.

Иммуногистохимические исследования морфофункциональной организации С-клеток щитовидной железы выполнены с помощью поликлональных кроличьих антител к кальцитонину (BioGenex, титр 1:40) и авидинбиотинопероксидазного набора для выявления кроличьих иммуноглобулинов (Sigma kit). Иммуногистохимическое выявление антигенов на гистологических срезах выполнено согласно стандартному протоколу для иммунопероксидазного метода [1].

Количественные исследования выбранных показателей в ткани селезенки и щитовидной железы выполнены с помощью системы компьютерного анализа микроскопических изображений (Imstar) с применением прикладных компьютерных лицензионных программ Morphostar и Colquant (Imstar), согласно основным принципам стереологии и морфометрии.

Для статистической обработки полученных результатов использовали t-критерий Стьюдента.

Результаты. В контрольной группе гистологическое строение селезенки соответствовало норме. Селезенка имела тонкую соединительнотканную капсулу, с отходящими от нее трабекулами. Ретикулярная ткань, образующая строму красной и белой пульпы, состояла из ретикулярных клеток, волокон и фибробластов. Белая пульпа была представлена совокупностью лимфоидных периартериальных муфт и лимфатических фолликулов правильной округлой формы.

Средняя площадь среза фолликулов, проходящая через реактивный центр, составляла в среднем 0,06 мм². В герминативных центрах фолликулов была верифицирована медленно пролиферирующая популяция иммунных клеток, наблюдалось около 60 фигур митоза и 100 клеток, погибающих и утилизирующихся в форме апоптоза. Индекс пролиферативной активности лимфоцитов в фолликулах селезенки составил 0,54.

Маргинальные зоны селезенки определялись в виде перифолликулярных колец шириной от 70 до 90 мкм и были плотно заполнены ретикулярными клетками, крупными лимфоцитами и макрофагами. Красная пульпа состояла из пульпарных тяжей и венозных синусов, заполненных форменными элементами крови. В субкапсулярной зоне и вдоль трабекул располагались многочисленные небольшие по размерам очаги миелоидного кроветворения.

Щитовидная железа у животных контрольной группы имела характерную структуру, представленную фолликулами различной формы, заполненных коллоидом. Каждый фолликул был ограничен базальной мембраной, на которой располагался слой эпителиальных клеток кубической формы. Кроме фолликулярного эпителия при окраске гематоксилином и эозином можно было различить более крупные парафолликулярные клетки (С-клетки) со светлой цитоплазмой, в которых иммуногистохимическим методом верифицировался кальцитонин. Количественная плотность С-клеток у интактных крыс составила 2424 ± 169 на 1 мм² ткани железы (табл. 2).

Во 2 группе через месяц после эпифизэктомии в селезенке наиболее существенные изменения наблюдались со стороны белой пульпы. Было отмечено двукратное увеличение размеров лимфоидных фолликулов и их герминативных зон (табл. 1). Число митозов и апоптозов лимфоцитов в реактивных зонах возросло соответственно в 3,2 и 1,4 раза по сравнению с контролем (табл. 1). Увеличение индекса пролиферативной активности лимфоцитов в 2,4 раза свидетельствует о сдвиге динамического равновесия в сторону гиперплазии лимфоидных элементов.

Таблица 1

Влияние эпифизэктомии, эпиталона и эпиталамина на морфометрические показатели, отражающие морфофункциональное состояние селезенки

№ группы	Площадь лимфотических фолликулов, мм ²	Число митозов лимфоцитов	Число апоптозов лимфоцитов	Индекс пролиферативной активности лимфоцитов
1	0.058±0.005	61±12	105±4	0.56±0.09
2	0.108±0.006*	197±17*	150±14*	1.32±0.07*
3	0.076±0.002**	120±6**	129±19	0.77±0.12**
4	0.070±0.005**	97±31**	103±10**	0.92±0.10**

Примечание: * – p<0,05 – по сравнению с контролем (1 группа).

** – p<0,05 – по сравнению со 2 группой.

Таким образом, отсутствие регуляции иммунной функции селезенки со стороны эпифиза приводило к нарушению процессов пролиферации и апоптоза иммунных клеток в сторону увеличения их числа.

Щитовидная железа через месяц после эпифизэктомии в целом сохраняла свои структурные особенности. Вместе с тем количество коллоида в фолликулах уменьшалось, а митотическая активность в фолликулярном эпителии усиливалась. По сравнению с контрольной группой количество С-клеток и оптическая плотность кальцитонин-положительных структур достоверно возросли относительно контроля соответственно в 1,24 и 1,1 раза. При этом объемная плотность С-клеток имела тенденцию к повышению, но достоверно не отличалась от группы интактных животных (табл. 2). Следовательно, эпифизэктомия приводит к усилению экспрессии кальцитонина и увеличению числа С-клеток поджелудочной железы.

Таблица 2

Влияние эпифизэктомии, эпиталона и эпиталамина на морфометрические показатели, отражающие морфофункциональное состояние щитовидной железы

№ группы	Объемная плотность С-клеток, %	Количество С-клеток	Оптическая плотность кальцитонин положительных структур, у.е.
1	14,5±1,9	2424±169	0,241±0,005
2	17,8±1,6	3012±172*	0,263±0,003*
3	9,5±1,5**	1575±163**	0,344±0,008**
4	10,7±2,0**	1783±129**	0,223±0,007**

Примечание: * – p<0,05 – по сравнению с контролем (1 группа).

** – p<0,05 – по сравнению со 2 группой.

В 3 группе через месяц после эпифизэктомии на фоне введения пептида эпифиза эпиталона на препаратах, окрашенных гематоксилином-эозином, наблюдалась нормализация гистоархитектоники белой пульпы. Под влиянием эпиталона фолликулы приобретали правильную округлую форму, а их размер уменьшался по сравнению со 2 группой в 1,4 раза и приближался к контрольному значению (табл. 1). Число митозов лимфоцитов в фолликулах селезенки достоверно снижалось в 1,6 раза по сравнению с эпифизэктомизированными животными 2 группы, однако апоптоз иммунных клеток хотя и имел тенденцию к снижению, но достоверно не отличался от значений, полученных во 2 группе. Эпиталон способствовал двукратному снижению индекса пролиферативной активности лимфоцитов у крыс с удаленным эпифизом, что свидетельствует о приближении данного показателя к контролю. Полученные данные свидетельствуют о том, что пептид эпифиза эпиталон способствует нормализации пролиферативной активности иммунных клеток селезенки, однако не оказывал влияния на их апоптоз в условиях эпифизэктомии.

Кроме того, у животных с удаленным эпифизом на фоне введения эпиталона наблюдалось двукратное снижение количества С-клеток и их объемной плотности по



сравнению со 2 группой, причем полученные значения были даже ниже, чем в контрольной группе (табл. 2). При этом оптическая плотность кальцитонин-положительных структур в щитовидной железе под действием эпиталона возрастало в 1,3 раза по сравнению со 2 группой. Полученные данные свидетельствуют, что пептид эпифиза эпиталон способствует снижению количества С-клеток щитовидной железы до нормального уровня, при этом их функциональная активность в отношении экспрессии кальцитонина возрастает.

В 4 группе через месяц после эпифизэктомии на фоне введения препарата эпифиза эпиталамина гистологическая структура селезенки была сходна с той, которая наблюдалась у животных 3 группы. Гистоархитектоника белой пульпы селезенки соответствовала картине, характерной для контрольной группы. Средняя площадь среза фолликулов, проходящая через реактивный центр, снижалась в 1,5 раза относительно 2 группы и приближалась к контрольным значениям (табл. 1). Количество фигур митозов лимфоцитов снижалось в 2 раза относительно 2 группы и достоверно не отличалось от контроля. В отличие от эпиталона, эпиталамин оказывал нормализующее действие не только на митотическую активность, но и на апоптоз иммунных клеток селезенки. Показано, что под влиянием эпиталамина количество клеток, вступивших в апоптоз, снижалось в 1,5 раза относительно 2 группы и достигало контрольного значения (табл. 1). Индекс пролиферативной активности лимфоцитов в фолликулах селезенки у животных 4 группы снижался в 1,4 раза по сравнению со 2 группой и приближался к контрольному значению. В целом, эффект эпиталамина оказался сходным с действием эпиталона – оба пептидных препарата эпифиза способствовали нормализации иммуногенеза в селезенке у эпифизэктомизированных мышей, однако эффект эпиталамина был более выраженным.

Модулирующее влияние эпиталамина в щитовидной железе было сходно с эффектом, оказываемым эпиталонам, и проявлялось в снижении количества С-клеток и их объемной плотности соответственно в 1,8 и 1,5 раза относительно 2 группы (табл. 2). При этом оптическая плотность кальцитонин-положительных структур в щитовидной железе под действием эпиталамина снижалась до контрольного уровня (табл. 2).

Заключение. Показано, что эпифизэктомия приводит к нарушению иммуногенеза и изменению гистоархитектоники белой пульпы селезенки, а также повышению числа кальцитонин продуцирующих С-клеток щитовидной железы. Пептидные препараты эпифиза эпиталамин и эпиталон восстанавливают гистологическую структуру селезенки после эпифизэктомии и способствуют нормализации ее иммунной функции. При этом в основе эффекта эпиталона лежит изменение митотической активности лимфоцитов белой пульпы селезенки, тогда как под действием эпиталамина все исследуемые показатели иммуногенеза восстанавливались до контрольного уровня за счет влияния как на пролиферативную активность лимфоцитов, так и на интенсивность апоптоза.

Кроме того, эпиталамин и эпиталон в условиях эпифизэктомии способствовали снижению числа С-клеток щитовидной железы до контрольного уровня и нормализации процессов синтеза кальцитонина.

Полученные данные позволяют сделать вывод о том, что пептидные препараты эпифиза эпиталон и эпиталамин являются веществами, замещающими регуляторную функцию эпифиза в отношении органов иммунной и эндокринной системы.

Литература

1. Автандилов, Г.Г. Диагностическая медицинская плоидометрия / Г.Г. Автандилов. – М.: Медицина, 2006. – 192 с.
2. Линькова, Н.С. Влияние пептидов эпифиза на функции тимуса при его старении / Н.С. Линькова (и др.) // Усп. геронтол. – 2010. – Т. 23. – № 4. – С. 543-546.
3. Полякова, В.О. Динамика процессов апоптоза и пролиферации клеток пинеальной железы человека при старении / В.О. Полякова, Н.С. Линькова, С.А. Пичугин // Бюлл. экп. биол. мед. – 2010. – Т. 150. – № 10. – С. 443-445.

4. Хавинсон, В.Х. Старение эпифиза / В.Х. Хавинсон, А.Г.Голубев // Усп. геронтол. – 2002. – Вып. 9. – С. 67-72.
5. Хавинсон, В.Х. Пептиды эпифиза и тимуса в регуляции старения / В.Х. Хавинсон, В.Г. Морозов. – СПб.: Фолиант, 2001. – 160 с.
6. Хавинсон, В.Х. 35-летний опыт исследований пептидной регуляции старения / В.Х. Хавинсон, В.Н. Анисимов // Усп. геронтол. – 2009. – Т. 22. – № 1. – С. 11-23.
7. Хавинсон, В.Х. Пептидная регуляция репаративных процессов в органах иммунной системы при ускоренном старении / В.Х. Хавинсон (и др.) // Научные ведомости БелГУ. Серия Медицина. Фармация. – 2010. – Вып. 12/1. – № 22 (93). – С. 57-61.
8. Anisimov, V.N. Peptide bioregulation of aging: results and prospects / V.N. Anisimov, V.Kh. Khavinson // Biogerontology. – 2010. – Vol. 11. – P. 139-149.
9. Khavinson, V.Kh. Gerontological aspects of genome peptide regulation / V.Kh. Khavinson, V.V. Malinin // Basel (Switzerland): Karger AG. – 2005. – 104 p.

PEPTIDES OF PINEAL GLAND RESTORED FUNCTION OF IMMUNE AND ENDOCRINE SYSTEMS AT PINEALECTOMYZED RATS

**N.S. Linkova
V. Kh. Khavinson
A.V. Trofimov
A.V. Dudkov**

*St.Petersburg Institute
of Bioregulation and Gerontology,
NMB of RAMS*

e-mail: miayy@yandex.ru

The number of immune cells at spleen and C-cells at thyroid gland increased after pinealectomy. These data demonstrated, that pinealectomy is the cause of abnormal neuroendocrine interactions.

Peptides of pineal gland epitalamin and epotalon restored apoptosis and proliferation processes balance at spleen and thyroid gland. Thereby, peptides of pineal gland have compensatory effects on immune and endocrine organs after pinealectomy.

Keywords: peptides of pineal gland, pinealectomy, spleen, thyroid gland.