УДК 577.2., 613.98.

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ АСПЕКТЫ ВОССТАНОВЛЕНИЯ ФУНКЦИЙ ЭПИФИЗА И СЕТЧАТКИ ПОД ДЕЙСТВИЕМ ЭПИТАЛОНА

Н.С. ЛИНЬКОВА
В.Е. ПРОНЯЕВА
А.В. ДУДКОВ
Н.П. АЛЕКСЕЕВ

Санкт-Петербургский институт биорегуляции и геронтологии СЗО РАМН

e-mail: miayy@yandex.ru

В работе отражены молекулярно-клеточные механизмы биологической активности тетрапептида эпиталона, восстанавливающего мелатонинобразующую способность эпифиза и функциональную активность клеток сетчатки глаза. Установлено, что эпиталон стимулирует пролиферацию в культурах клеток эпифиза и сетчатки, что может быть обусловлено онто- и филогенетической общностью клеток этих органов. В пинеалоцитах эпиталон снижает уровень апоптоза, что может лежать в основе его эффективности как геропротекторного препарата, восстанавливающего функции эпифиза. В сетчатке эпиталон индуцирует дифференцировку нейронов, что лежит в основе его регенерационного эффекта при повреждениях ретинальной ткани.

Ключевые слова: эпиталон, эпифиз, сетчатка, сигнальные молекулы.

Общность онтогенеза эпифиза и сетчатки – развитие из нейроэктодермы – обусловливает наличие тесной функциональной связи между ними. Секреция мелатонина эпифизом синхронизирована с уровнем освещенности, изменения которого передаются от сетчатки по ретиногипоталамическому тракту в эпифиз [9, 10]. При этом суточный ритм обновления наружных сегментов фоторецепторов сетчатки подчиняется циркадианным ритмам, регулируемым эпифизом. Кроме того, в сетчатке обнаружены рецепторы к мелатонину и секреция данного гормона в фоторецепторах [11]. У пожилых людей часто наблюдается нарушение ритмичности синтеза мелатонина в эпифизе, что еще более усугубляется при дистрофических заболеваниях сетчатки и снижении электрической активности ее нейронов. Функциональная и онтогенетическая общность эпифиза и сетчатки позволила разработать эффективный геропротекторный лекарственный препарат эпиталон, восстанавливающий активность обоих органов.

Тетрапептид эпиталон (Ala-Glu-Asp-Gly) восстанавливает уровень секреции мелатонина при старении эпифиза у человека и животных, что способствует увеличению средней и максимальной продолжительности жизни и снижению опухолеобразования [1-2, 7-8]. На молекулярном уровне механизм действия эпиталона связан с усилением секреции фермента арилалкиламин – N-ацетилтрансферазы (AANAT) и транскрипционного протеина pCREB в пинелоцитах [5]. Эпиталон также запатентован как лекарственный препарат, стимулирующий электрическую активность нейронов сетчатки и применяющийся в терапии дистрофических заболеваний сетчатки и диабетической ретинопатии у лиц пожилого возраста [3, 4].

Целью данной работы явилось изучение общих молекулярно-клеточных механизмов восстановления функций эпифиза и сетчатки под влиянием эпиталона.

Материалы и методы. Для получения эпифиза использовали самцов крыс линии Wistar в возрасте 24 мес., полученных из питомника Института физиологии имени И.П. Павлова РАН (Санкт-Петербург). Сетчатку забирали от 10-дневных эмбрионов цыплят, полученных ФГБУ НИИ гриппа Минздравсоцразвития России (Санкт-Петербург). Выбор эмбрионов цыплят для исследования сетчатки был обусловлен тем, что этот объект является общепринятым в физиологии, кроме того, данный тип сетчатки ближе по своему строению к человеческой в сравнении с крысиной. Эпифиз и сетчатку, выделенные у животных с помощью инструментов для глазной хирургии, помещали в стерильную чашку Петри и разделяли на эксплантаты (фрагменты около 1 мм^3). Эксплантаты размещали по 10 штук на чашку Петри с коллагеновым покрытием (размер 3.5×2.5 мм, Jet Biofil) и культивировали в 3 мл питательной среды, состоящей из 45% раствора Хенкса, 45% среды Игла, 10% фетальной бычьей сыворотки, глюкозы (10 мг/мл) и гентамицина (0.5 мг/мл).

Эксплантаты эпифиза (n=50) и сетчатки (n=50) были разделены на 2 равные группы – контрольную (введение физиологического раствора) и подопытную (введение пептида эпиталона в концентрации 0,05 нг/мл). Все эксплантаты культивировали в CO_2-инкубаторе при температуре 36,7°С в среде с 5% содержанием CO_2. Продолжительность культивирования составила 3 суток, так как известно, что именно такой временной интервал является необходимым для формирования зоны роста, состоящей из пролиферирующих и мигрирующих клеток с примесью фибробластов [6].

Фиксацию эксплантатов для проведения иммуноцитохимического исследования в зоне роста эксплантатов осуществляли 95% этиловым спиртом, охлажденным до -20°С.

Иммуноцитоохимическую реакцию проводили с антителами к маркерам пролиферации Ki67 (1:50, Novocastra), апоптоза p53 (1:50, Novocastra) и дифференцировки Cxcl12, Pax6 (1:50, Dako) с использованием стандартного одноэтапного протокола с высокотемпературной демаскировкой антигена в цитратном буфере (pH=6.0). В качестве вторичных антител использовали универсальный набор, содержащий биотинилированные антимышиные иммуноглобулины. Для визуализации реакции применяли комплекс авидина с биотинилированной пероксидазой хрена и диаминобензидином (ABC-kit, Dako). Морфометрический подсчет данных осуществляли с помощью системы компьютерного анализа микроскопических изображений, включавшей в себя микроскоп NikonEclipseE400, цифровую камеру NikonDXM1200, компьютер на базе IntelPentium 4 и программное обеспечение «VidiotestMorphology 5.0». В каждом случае анализировали 5 полей зрения при увеличении 100. Площадь экспрессии маркеров рассчитывали как отношение площади, занимаемой иммунопозитивными клетками, к общей площади клеток в поле зрения и выражали в процентах. Оптическую плотность экспрессии измеряли в условных единицах (у.е.). Площадь экспрессии характеризует количество клеток, на которых экспрессируется исследуемый маркера, а оптическая плотность – количество маркерного белка, выделяемого одной клеткой. Для статистического анализа достоверности различий оптической плотности между группами применяли двухвыборочный критерий Вилкоксона ранговых сумм. Статистическую обработку данных проводили в программе Statistica 7.0.

Результаты. Экспрессия исследуемых сигнальных молекул была выявлена во всех образцах эпифиза и сетчатки, что свидетельствует об активном процессе клеточного обновления, включающего в себя процессы пролиферации, дифференцировки и апоптоза в культурах клеток.

Эпиталон стимулировал экспрессию пролиферативного протеина Ki67 в культурах клеток эпифиза и сетчатки. Площадь и оптическая плотность экспрессии маркера Ki67 в эпифизе под действием эпиталона возрастала соответственно в 2 и 1,3 раза, а в сетчатке – в 2,5 и 1,3 раза по сравнению с контролем (табл. 1, 2). Таким образом, эпиталон стимулирует пролиферацию культур клеток эпифиза и сетчатки.

Таблица 1

Влияние эпиталона на площадь экспрессии сигнальных молекул в культуре клеток эпифиза и сетчатки

Маркер	Группа	Эпифиз	Сетчатка
Ki67	контроль	0,007±0,0004	0,040±0,005
	эпиталон	0,015±0,003*	0,100±0,010*
Pax6	контроль	0,003±0,001	0,026±0,009
	эпиталон	0,003±0,002	0,058±0,011*
Cxcl12	контроль	0,0061±0,0002	0,011±0,003
	эпиталон	0,0054±0,0004	0,009±0,0002
p53	контроль	0,150±0,02	0,081±0,009
	эпиталон	0,017±0,001*	0,087±0,011

* - $p<0,05$ по сравнению с соответствующим контролем.

Экспрессия маркера дифференцировки Pax6 под действием эпиталона возрастала в сетчатке, но не изменялась в эпифизе. Площадь и оптическая плотность экспрессии протеина Pax6 под влиянием эпиталона в сетчатке возрастала соответственно в 2,2 и в 1,4 раза по сравнению с контролем (табл. 1, 2). Усиление экспрессии маркера Pax6 в сетчатке свидетельствует о начальной дифференцировке в направлении предшественников амакриннных и горизонтальных клеток. В эпифизе белок Pax6 участвует в дифференцировке пинеалоцитов, однако, поскольку культура клеток эпифиза была получена от взрослых животных, представляется вероятным, что эпиталон не стимулирует созревание пинелоцитов по причине их исходно низкого дифференцировочного потенциала (табл. 1, 2). Это предположение подтверждается данными по изучению влияния эпиталона на другой маркер дифференцировки клеток – Cxcl12. В сетчатке под действием эпиталона наблюдалось увеличе-

ние оптической плотности экспрессии Cxcl12 в 1,4 раза, однако при этом площадь экспрессии не изменялась.

Таблица 2

Влияние эпиталона на оптическую плотность экспрессии сигнальных молекул в культуре клеток эпифиза и сетчатки

Маркер	Группа	Эпифиз	Сетчатка
Ki67	контроль	0,21±0,01	0,67±0,05
	эпиталон	0,27±0,01*	0,86±0,07*
Pax6	контроль	0,23±0,04	0,62±0,05
	эпиталон	0,19±0,03	0,87±0,07*
Cxcl12	контроль	0,30±0,04	0,72±0,07
	эпиталон	0,26±0,04	0,99±0,03*
p53	контроль	0,27±0,02	0,80±0,006
	эпиталон	0,19±0,02*	0,72±0,011

* - $p<0,05$ по сравнению с соответствующим контролем.

Эпиталон снижал уровень апоптоза в клетках эпифиза, но не влиял на данный показатель в сетчатке. Площадь и оптическая плотность экспрессии проапоптотического белка p53 при введении эпиталона снижалась соответственно и в 8,8 и 1,4 раза (табл. 1, 2).

В основе способности эпиталона восстанавливать функции эпифиза и сетчатки лежат различные молекулярные механизмы. Эпиталон стимулирует пролиферацию и снижает уровень апоптоза в культуре клеток эпифиза, что позволяет повысить число функционально активных пинеалоцитов и согласуется с данными по стимулирующему действию эпиталона на синтез фермента AA-NAT, участвующего в продукции мелатонина в пинеалоцитах [5]. Кроме того, сочетание снижение уровная апоптоза, усиливающего при старении и индукции клеточной пролиферации объясняет восстановление суточного ритма секреции мелатонина после введения эпиталона у человека и животных [2]. В сетчатке эпиталон стимулирует пролиферацию и дифференцировку клеток, но не влияет на апоптоз. Усиление экспрессии пролиферативного маркера Ki67 в культуре клеток сетчатки подтверждает полученные ранее данные, свидетельствующие об увеличении выживаемости нейронов сетчатки и клеток пигментного эпителия под действием эпиталона [4]. Вероятно, в сетчатке, в отличае от эпифиза, эпиталон одновременно затрагивает 2 параллельных процесса, связанных с повышением функциональной активности клеток, но не с их гибелью. Стимулируя пролиферацию полипотентных клеток сетчатки, а затем их дифференцировку, эпиталон способствует восстановлению ткани сетчатки при различных повреждениях. Вероятно, стимулирующий эффект эпиталона на пролиферацию клеток эпифиза и сетчатки обусловлен онто- и филогенетической общностью этих тканей и высокой степенью их функциональной взаимосвязи.

Таким образом, в основе повышения мелатонинобразующей способности эпифиза и репарации ткани сетчатки под действием эпиталона лежит его способность стимулировать пролиферацию и снижать апоптоз в пинеальной железе, а также индуцировать пролиферацию и дифференцировку ретинальных клеток.

Литература

1. Гончарова, Н.Д. Пептидная коррекция возрастных нарушений функции эпифиза у обезьян / Н.Д. Гончарова, А.А. Венгерин, В.Х. Хавинсон // Успехи геронтологии. – 2003. – Вып. 12. – С. 121-127.

2. Нормализующее влияние пептидов эпифиза на суточный ритм мелатонина у старых обезьян и людей пожилого возраста / О.В. Коркушко, Б.А. Лапин, Н.Д. Гончарова, В.Х. Хавинсон, В.Б. Шатило, А.А. Венгерин, И.А. Антонюк-Щеглова, Л.В. Магдич // Успехи геронтологии. – 2007. – Т. 20, № 1. – С. 74-85.

3. Хавинсон, В.Х. Тетрапептид, стимулирующий функцию сетчатой оболочки глаза, фармакологическое средство на его основе и способ применения. 20.01.2001 / В.Х. Хавинсон // Патент РФ. –RU 2161982 C1.

4. Влияние пептидов на пролиферативную активность клеток сетчатки и пигментного эпителия/ В.Х. Хавинсон, В.Н. Земчихина, С.В. Трофимова, В.В. Малинин // Бюлл. эксп. биол. мед. – 2003. – Т. 135, № 6. – С. 700-702.

5. Молекулярно-клеточные механизмы пептидной регуляции синтеза мелатонина в культуре пинелоцитов / В.Х. Хавинсон, Н.С. Линькова, И.М. Кветной, Т.В. Кветная, В.О. Полякова, Х. Корф // Бюлл. эксп. биол. мед. – 2012. – Т. 153, № 2. – С. 223-226.

6. Методика создания монослоя клеток на базе органотипической культуры для тестирования физиологически активных веществ / В.Х. Хавинсон, Н.С. Линькова, В.Е. Проняева, Н.И. Чалисова, Е.А. Концевая, В.О. Полякова, Т.В. Кветная, И.М. Кветной, Г.М. Яковлев // Бюлл. эксп. биол. мед. – 2012. – № 2. – С. 759-763.

7. Anisimov, V.N. Peptide bioregulation of aging: results and prospects / V.N. Anisimov, V.Kh. Khavinson // Biogerontology. – 2010. – № 11. – P. 139-149.

8. Khavinson, V.Kh. Short Peptides Modulate the Effect of Endonucleases of Wheat Seedling / V.Kh. Khavinson, L.I. Fedoreeva, B.F. Vanyushin // Doklady Biochemistry and Biophysics. – 2011. – Vol. 437. – P. 64-67.

9. Kvetnoy, I.M. Diffuse neuroendocrine system and mitochondrial diseases: molecular and cellular bases of pathogenesis, new approaches to diagnosis and therapy / I.M. Kvetnoy, J. Hernández-Yago, J.M. Hernández // Neuro Endocrinol Lett. – 2000. – Vol. 21, № 2. – P. 83-99.

10. Functional Unity of the Thymus and Pineal Gland and Study of the Mechanisms of Aging / V.O. Polyakova, N.S. Linkova, I.M. Kvetnoy, V.Kh. Khavinson // Bul. Exp. Biol. Med. –2011. – Vol. 151, №.5. – P. 627-630.

11. Visual photoreceptor subtypes in the chicken retina: melatonin-synthesizing activity and in vitro differentiation / P. Voisin, V. Cailleau, N. Naud, A. Cantereau, M. Bernard // Cell Tissue Res. – 2012. – Vol. 134. – P. 1123-11128.

MOLECULAR ASPECTS OF PINEALON EFFECTS ON RESTORATION PINEAL GLAND AND RETINA'S FUNCTIONAL ACTIVITY

N.S. LINKOVA, V.E. PRONAYEVA, A.V. DUDKOV, N.P. ALEXEEV

Saint Petersburg Institute of bioregulation and gerontology

e-mail: miayy@yandex.ru

The work presents the investigation of molecular mechanisms of biological activity of tetrapeptide epitalon, which can restore melatonin synthesis in the pineal gland and functional activity of retina. Epitalon stimulates proliferation in cell cultures from pineal gland and retina, which can be explain by onto- and filogenesis unity of these organs. Epitalon discreases apoptosis level in pinelocytes and stimulates neuronal differentiation in the retina.

Keywords: epitalon, pineal gland, retina, signal molecules.