

© Коллектив авторов, 2006
УДК 611.814.1.018:612.67:599.323.4

*Е.Д. Бажанова**, *В.Н. Молодцов¹* и *К.И. Павлов²*

ИЗМЕНЕНИЯ ЭКСПРЕССИИ АПОПТОЗ-АССОЦИИРОВАННЫХ МОЛЕКУЛ В НЕЙРОСЕКРЕТОРНЫХ КЛЕТКАХ ГИПОТАЛАМУСА МЫШЕЙ ПРИ СТАРЕНИИ

* Лаборатория сравнительной сомнологии и нейроэндокринологии (зав. — д-р мед. наук Г.А.Оганесян) Института эволюционной физиологии и биохимии им. И.М.Сеченова РАН, Санкт-Петербург; ¹ факультет биомедицинских наук, Стратфордское отделение, Медицинский и стоматологический университет, Стратфорд, Нью-Джерси, США; ² кафедра физиологии человека (зав. — д-р биол. наук Ю.А.Даринский) Российского государственного педагогического университета им. А.И. Герцена, Санкт-Петербург

Цель работы — выявить особенности регуляции апоптоза в нейросекреторных центрах старых (в возрасте 18 мес) мышей при воздействии иммуномодулятора интерферона-альфа (ИА) в сравнении с таковой у молодых (2-месячных) мышей. Показано, что возрастная активация апоптоза в супраоптическом (СОЯ) и паравентрикулярном (ПВЯ) ядрах опосредуется различными путями и может быть результатом изменений в соотношении синтеза про- (Бах) и антиапоптотических (Mcl-1, Bcl-2) молекул. Кроме того, сигнальный каскад апоптоза у молодых мышей при действии ИА идентичен в обоих ядрах, тогда как у старых мышей есть различия между СОЯ и ПВЯ.

Ключевые слова: нейросекреторные клетки, апоптоз, старение, интерферон-альфа.

Нейроэндокринная система — это сложный комплекс, главной функцией которого является поддержание гомеостаза на всех стадиях онтогенеза [3]. При старении в гипоталамусе увеличивается число нейросекреторных клеток (НСК), гибнущих путем апоптоза [1]. Это ведет к гормональному дисбалансу и нарушению адаптации организма.

Большинство внутриклеточных факторов, участвующих в регуляции апоптоза, являются белками или пептидами. Хорошо известно семейство белков Bcl-2. Антиапоптотический белок Bcl-2 предупреждает гибель клеток, ограничивая выход цитохрома с из митохондрий в цитоплазму [7]. Другой член данного семейства, ингибитор апоптоза Mcl-1, предотвращает активацию прокаспазы-8, нарушая каскад апоптоза. Экспрессия Bcl-2 и Mcl-1 может активироваться различными факторами роста и выживания, в том числе цитокинами (интерферонами) и инсулином/инсулиноподобными пептидами [9, 14]. К этому семейству принадлежит индуктор апоптоза белок Бах, активирующий через ряд факторов каспазу-9 и далее каспазу-3 [7]. Известно, что белки семейства Bcl-2 существуют в клетке в виде гомо- и гетеродимеров, состоящих из членов их семейства, и отношение активных про- и антиапоптотических молекул в белковых комплексах определяет выживание клетки или гибель [15].

Мы предполагаем, что причиной гибели НСК при старении может быть дисбаланс анти- и про-

апоптотических белков, характерный, вероятно, для поздних этапов онтогенеза. Цель данной работы — проверить это предположение, для чего была изучена экспрессия апоптоз-ассоциированных молекул в гипоталамусе мышей разного возраста в сравнении с уровнем апоптоза, а также исследовано действие интерферона-альфа (ИА) — фактора, регулирующего апоптоз — на зависимый от возраста апоптоз НСК гипоталамуса.

Материал и методы. Использованы молодые и старые (2 и 18 мес) белые беспородные мыши-самцы, разделенные на 2 группы: 1-я — интактные мыши (контроль: 4 молодых и 4 старых); 2-я — 4 молодых и 4 старых мыши, получавшие ИА (Interferon leucocytic human siccum, 500 МЕ/мл; НПО Биомед, Россия) интраназально по 50 мкл 2 раза в сутки в течение 3 сут, декапитацию производили на 4-е сутки. Материал — гипоталамическую область мозга — после фиксации в 4% параформальдегиде и проводки заливали в парафин. На чередующихся срезах, содержащих крупноклеточное супраоптическое (СОЯ) и крупноклеточную часть паравентрикулярного (ПВЯ) ядра, определяли уровень апоптоза, подсчитывая клетки с высокой интенсивностью свечения конденсированного хроматина, окрашенного этидием бромидом (апоптотические клетки). Для определения относительного соотношения апоптотических клеток в изучаемых ядрах подсчитывали общее число НСК в ядре и отдельно число клеток, подвергшихся апоптозу. Затем определяли долю апоптотических клеток в каждом из нейросекреторных центров (НСЦ) на одно животное и далее на всю группу.

Для выявления апоптоз-ассоциированных молекул в НСК проводили: двойную иммуногистохимическую (ИГХ) реак-

* e-mail: bazhanovae@mail.ru

цию с немечеными поликлональными антителами к анти-апоптотическим белкам Bcl-2 (1:600; BD Biosciences, США) (визуализация с помощью флюоресцентно меченных вторичных поликлональных антител Cy-2, 1:50; Acris Antibodies GmbH, Германия) и Mcl-1 (5 мкл/мл; BD Biosciences, США) (визуализация с помощью флюоресцентно меченных вторичных поликлональных антител Cy-3, 1:50; Acris Antibodies GmbH, Германия) и двойную ИГХ реакцию с немечеными поликлональными антителами к белку Bcl-2 (1:600; BD Biosciences, США) (визуализация — Cy-2, 1:50) и проапоптотическому белку Вах (1:500; BD Biosciences, США) (визуализация — Cy-3, 1:50).

В НСК определяли максимальную яркость Bcl-2-, Mcl-1- и Вах-иммунореактивного (ИР) вещества на 5–6 срезах для каждого животного, отдельно в каждом ядре. Затем вычисляли среднюю максимальную яркость (в относительных единицах, представляющих отношение яркости фона к яркости объекта) изучаемых белков в НСК для группы мышей. Кроме того, подсчитывали число НСК с солокализацией Bcl-2 и Mcl-1, Bcl-2 и Вах.

Анализ изображения производили с помощью флюоресцентного микроскопа PFM (WPI), цветной цифровой камеры Leica DFC 300 FX (Германия), разрешение 1392×1040 пикселей, об. 40 и программы VideoTest.

Значимость различий определяли с использованием t-критерия Стьюдента, и считали их значимыми при $P < 0,05$ (Microsoft Excel 5.0a).

Результаты исследования. У молодых мышей уровень апоптоза НСК невысок и примерно одинаков в СОЯ и ПВЯ (рис. 1). Были выявлены значительные зависящие от возраста изменения в регуляции физиологического состояния НСК. Это подтверждается резким возрастанием уровня апоптоза в СОЯ (см. рис. 1, 2) и ПВЯ при старении (см. рис. 1).

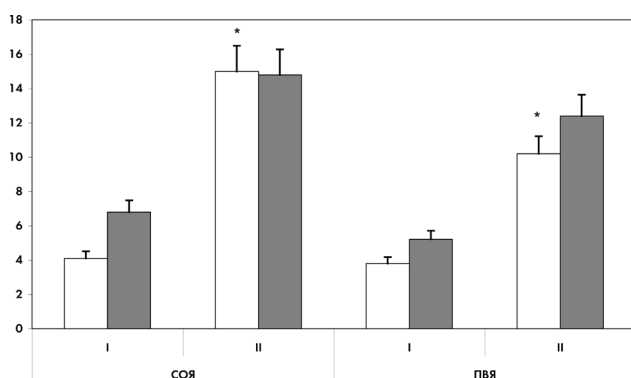


Рис. 1. Относительное содержание апоптотических нейросекреторных клеток в супраоптическом (СОЯ) и паравентрикулярном (ПВЯ) ядрах у молодых (I) и старых (II) мышей.

Светлые столбики — интактные животные (контроль); заштрихованные столбики — животные, получавшие интерферон-альфа. По оси ординат — исследованный параметр (%); звездочки — различия значимы между показателями у молодых и старых мышей. Вертикальные отрезки — значения стандартной ошибки.

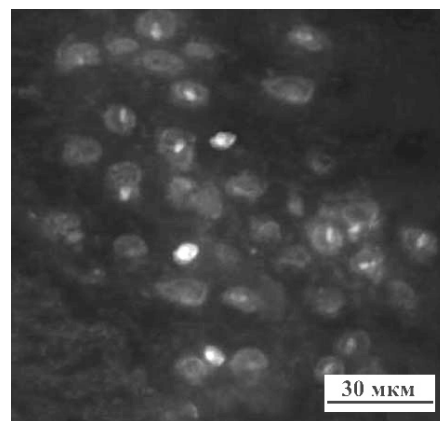


Рис. 2. Нейросекреторные клетки супраоптического ядра старой интактной мыши.

Апоптотические клетки обведены кружком. Окраска этидием бромидом.

В НСК у молодых мышей синтезируются все изученные члены семейства Bcl-2, уровень их экспрессии примерно одинаков в СОЯ и ПВЯ. Обнаружено, что в СОЯ у старых интактных мышей экспрессия антиапоптотических белков Mcl-1 и Bcl-2 стабильна, с некоторой тенденцией к повышению (рис. 3, а, б). Однако эти белки не способны предотвратить возрастной апоптоз НСК СОЯ, вызванный, вероятно, повышением синтеза проапоптотического белка Вах (см. рис. 3, в). Это свидетельствует о значительном изменении протекания клеточных процессов при старении.

Обратное соотношение наблюдается в ПВЯ у старых контрольных мышей. Так, синтез Вах не изменяется (см. рис. 3, в), но экспрессия белков — ингибиторов апоптоза, Mcl-1 и Bcl-2 снижена, что также может служить причиной повышения клеточной гибели (см. рис. 3, а, б).

В НСК Mcl-1 в основном солокализован с Bcl-2, Вах также синтезируется большей частью в Bcl-2-ИР НСК как у молодых, так и у старых мышей.

Результаты исследования ИА не подтвердили его позитивного влияния на выживаемость НСК у молодых и старых животных. Вместе с тенденцией возрастания апоптоза (см. рис. 1) в изученных НСК мышей обеих возрастных групп при введении ИА наблюдалось угнетение синтеза Bcl-2 (см. рис. 3, в; 4, а, б). У молодых мышей обработка ИА не повлияла на синтез Mcl-1 и Вах (см. рис. 3, а, в). Это можно объяснить тем, что молодой организм более устойчив к действию стресс-факторов, в частности ИА.

У старых мышей, получавших ИА, в обоих ядрах возросла экспрессия Mcl-1 (см. рис. 3, а). Белок Вах, однако, по-разному экспрессировался в НСК старых мышей, получавших ИА: его

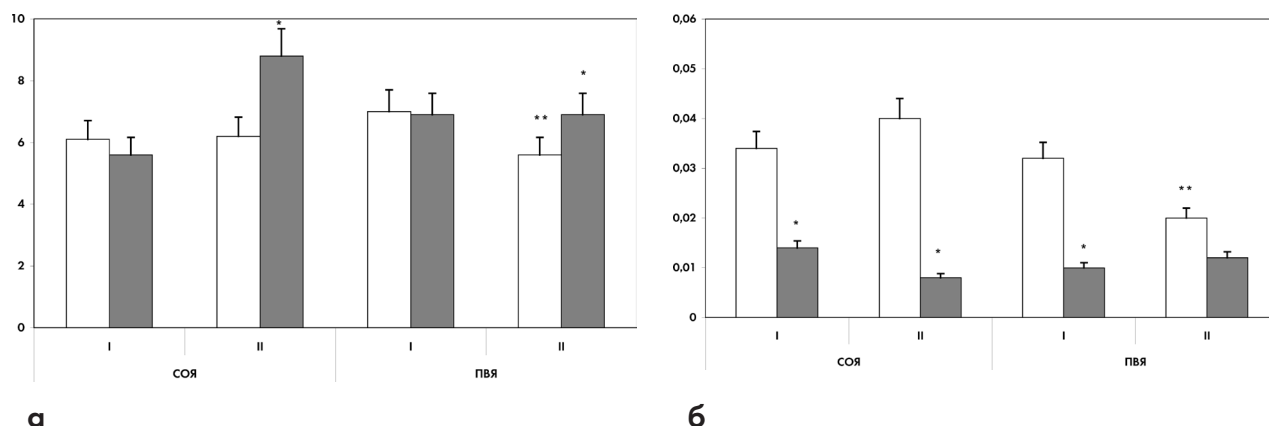


Рис. 3. Содержание Mcl-1-ИР (а), Bcl-2-ИР (б), Вах-ИР (в) материала в нейросекреторных клетках в супраоптическом (СОЯ) и паравентрикулярном (ПВЯ) ядрах у молодых (I) и старых (II) мышей.

Светлые столбики — интактные животные (контроль); заштрихованные столбики — животные, получавшие интерферон-альфа. По оси ординат — исследованный параметр (усл. ед.); звездочка — различия значимы по сравнению с контролем, две звездочки — различия значимы между показателями у молодых и старых мышей. Вертикальные отрезки — значения стандартной ошибки.

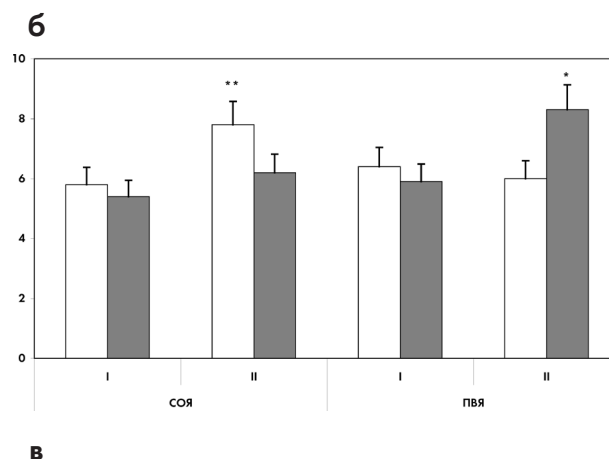
содержание было неизменным в нейронах СОЯ и повышалось в клетках ПВЯ (см. рис. 3, в; 4, в, г). Таким образом, уровень апоптоза в обоих НСК у старых подопытных животных остался прежним, хотя и высоким, в результате повышения содержания Mcl-1.

Итак, введение ИА оказывает значительное действие на экспрессию белков семейства Bcl-2 в гипоталамических НСК, и оно зависит от стадии онтогенеза (таблица).

Изменение содержания апоптоз-ассоциированных молекул и уровня апоптоза в нейросекреторных центрах гипоталамуса молодых и старых мышей при введении интерферона-альфа

Исследованные показатели	Молодые мыши		Старые мыши	
	СОЯ	ПВЯ	СОЯ	ПВЯ
Апоптоз	=	=	=	=
Содержание Mcl-1	=	=	↑	↑
Содержание Bcl-2	↓	↓	↓	↘
Содержание Вах	=	=	=	↑
Содержание инсулина [2]	↓	↓	=	=

Примечание. СОЯ — супраоптическое ядро; ПВЯ — паравентрикулярное ядро. Знак = — нет изменений показателя; ↓ — снижение показателя; ↑ — увеличение показателя; ↘ — тенденция к снижению показателя.



Обсуждение полученных данных. При старении апоптоз интенсифицируется во многих тканях, в том числе в нейронах мозга [13, 19]. По нашему мнению, этот факт свидетельствует о реализации клетками финальной стадии своей естественной программы развития, т. е. апоптоз при старении является показателем успешного завершения жизненного цикла клетки. Доля гибнущих нейронов зависит от возраста животного, области мозга, физиологического или патологического (нейродегенеративные болезни и т. д.) старения. Уровень апоптоза НСК при старении, наблюдаемый нами, сравним с таковым при физиологическом старении [4]. Мы предполагаем, что физиологический статус НСК у старых животных сильно отличается от их состояния у молодых мышей, прежде всего, вследствие появления проапоптозной составляющей, т. е. метаболизм стареющей клетки как бы направлен к смерти. Причины активации такой «апоптозной доминанты» и возможные механизмы ее появления мы старались выяснить, анализируя содержание инсулина [2] — как фактора выживания клетки, а также белков Вах, Bcl-2 и Mcl-1 — как про- и антиапоптозных факторов.

С возрастом в различных тканях меняется экспрессия апоптоз-зависимых молекул. Так, при старении содержание Bcl-2 повышается в лимфо-

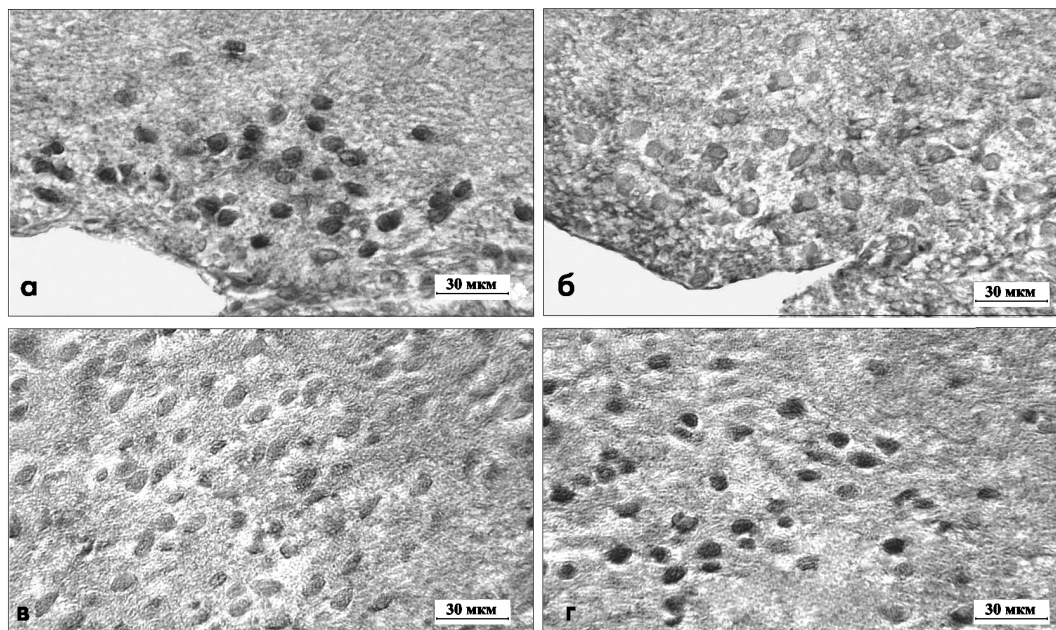


Рис. 4. Нейросекреторные клетки (НСК) супраоптического ядра молодых мышей (а, б) и паравентрикулярного ядра старых мышей (в, г).

а, в — НСК intactных мышей; б, г — НСК мышей, получавших интерферон-альфа. а, б — иммуногистохимическая реакция с антителами к Bcl-2; в, г — иммуногистохимическая реакция с антителами к Bax.

цитах человека [16], в нейронах мозжечка и гиппокампа крыс [10], однако не изменяется в мононуклеарных клетках крови человека [11]. Мы показали, что при старении происходят глубокие изменения экспрессии белков в НСК, хотя некоторые физиологические критерии (синтез вазопрессина) остаются неизменными [2, 6]. Можно предположить, что эти изменения направлены на развитие внутриклеточной проапоптотической доминанты в этих клетках, согласно их генетической программе. Ранее в гипоталамических НСК был выявлен инсулин, который, вероятно, играет роль фактора выживания клетки. При старении содержание инсулина снижается и в СОЯ, и в ПВЯ [2]. Анализ наших данных позволяет говорить о дисбалансе апоптоз-ассоциированных молекул (Bcl-2, Mcl-1, Bax, инсулин [2]) в НСК при старении, что повышает чувствительность клетки к апоптозу и может являться одной из причин возрастания частоты нейрональной смерти.

Регуляция апоптоза одинакова в изучаемых НСК у молодых мышей. Однако пути, приводящие стареющую клетку к гибели, различаются в СОЯ и ПВЯ. В данных НСК по-разному снижается синтез антиапоптотических молекул (в ПВЯ — уменьшение экспрессии Mcl-1, Bcl-2, инсулина [2], в СОЯ — только инсулина [2]), а в СОЯ, кроме того, усиливается проапоптотическое звено (повышается содержание Bax). Это свидетельствует о тесной связи старения и апоптоза.

По литературным данным, инсулин в нейронах, связываясь со своим мембранным рецеп-

тором, активирует PI3K/Akt-cAMP сигнальный путь, который может переключать внутриклеточные процессы, направляя текущий статус на метаболизм, клеточный рост и пролиферацию или апоптоз [12]. Предупреждая апоптоз, инсулин способен индуцировать экспрессию Bcl-2 [18] и подавлять активацию проапоптотических белков каспазы-3 и Bad [5, 17]. Итак, низкое содержание инсулина в изучаемых НСК у старых животных изменяет физиологический статус этих клеток, способствуя клеточной смерти [2]. Снижение содержания инсулина, вероятно, может также приводить к зависимому от возраста уменьшению экспрессии C-fos в НСК [1]. Снижение способности НСК активировать гены предраннего ответа (c-fos) в ответ на внеклеточные сигналы может быть одной из причин, приводящих к значительной потере нейронов СОЯ и ПВЯ при старении.

В совокупности наши данные подтверждают предположение об апоптозе при старении как конечном пункте генетически программированного плана развития.

По литературным данным, ИА оказывает различное действие на регуляцию апоптоза [8, 9, 14]. Наши результаты показывают, что, несмотря на значительные изменения в экспрессии белков семейства Bcl-2 при кратковременном действии ИА, отношения про- и антиапоптотических молекул, вероятно, остаются достаточно стабильными для поддержания уровня апоптоза, характерного для НСК на данной стадии онтогенеза (см. таблицу).

Изменения белкового синтеза, обнаруженные нами, позволяют предположить, что долговременное введение ИА может привести к негативным последствиям, особенно у старых животных, более чувствительных к изменениям физиологического статуса.

Проведенное исследование позволяет сделать ряд выводов. Причиной возрастания гибели НСК при старении является дисбаланс апоптоз-регулирующих белков (Bcl-2, Mcl-1, инсулин [2], Вах). Регуляция апоптоза НСК зависит от стадии онтогенеза. Так, механизмы реализации апоптоза в СОЯ и ПВЯ примерно одинаковы у молодых животных, однако различаются при старении. Показано, что ИА способен подавлять синтез Bcl-2 в НСК у животных разного возраста, а также инсулина в НСК у молодых мышей [2]. Участие ИА в регуляции белкового синтеза в СОЯ и ПВЯ имеет существенные отличия у мышей на поздних этапах онтогенеза в сравнении с таковым у молодых животных.

ЛИТЕРАТУРА

- Бажанова Е.Д. и Теплый Д.Л. Влияние интерферона-альфа на гипоталамо-гипофизарно-адренокортикальную систему мышей при старении. Журн. эволюц. биохим., 2003, т. 39, № 5, с. 482–487.
- Молодцов В.Н., Сенченков Е.В. и Бажанова Е.Д. Апоптоз и экспрессия вазопрессина, инсулина и Bcl-2 в нейросекреторной системе старых мышей. Журн. эволюц. биохим., 2006, т. 42, № 3, с. 238–288.
- Поленов А.Л., Константинова М.С. и Гарлов П.Е. Гипоталамо-гипофизарный нейроэндокринный комплекс. В кн.: Нейроэндокринология. Ч. 1. СПб., Изд-во РАН, 1993, с. 139–187.
- Andreasson K.I., Savonenko A., Vidensky S. et al. Age-dependent cognitive deficits and neuronal apoptosis in cyclooxygenase-2 transgenic mice. J. Neurosci., 2001, v. 21, p. 8198–8209.
- Barber A.J., Nakamura M., Wolpert E.B. et al. Insulin rescues retinal neurons from apoptosis by a phosphatidylinositol 3-kinase/Akt-mediated mechanism that reduces the activation of caspase-3. J. Biol. Chem., 2001, v. 276, p. 32814–32821.
- Bazhanova E.D., Chernigovskaya E.V. and Danilova O.A. Different pathways of neurohormonal hypothalamic control of the adrenal cortex function in young and old rats. Mech. Ageing Dev., 2000, v. 118, p. 91–102.
- Cai J., Yang J. and Jones D.P. Mitochondrial control of apoptosis: the role of cytochrome c. Biochim. Biophys. Acta, 1998, v. 1366, p. 139–149.
- Epling-Burnette P.K., Liu J.H., Catlett-Falcone R. et al. Inhibition of STAT3 signaling leads to apoptosis of leukemic large granular lymphocytes and decreased Mcl-1 expression. J. Clin. Invest., 2001, v. 107, p. 351–362.
- Jourdan M., de Vos J., Mechti N. and Klein B. Regulation of Bcl-2-family proteins in myeloma cells by three myeloma survival factors: interleukin-6, interferon-alpha and insulin-like growth factor 1. Cell Death Differ., 2000, v. 7, p. 1244–1252.
- Kaufmann J.A., Bickford P.C. and Tagliatela G. Oxidative-stress-dependent up-regulation of Bcl-2 expression in the central nervous system of aged Fisher-344 rats. J. Neurochem., 2001, v. 76, p. 1099–1108.
- Monti D., Salvioli S., Capri M. et al. Decreased susceptibility to oxidative stress-induced apoptosis of peripheral blood mononuclear cells from healthy elderly and centenarians. Mech. Ageing Dev., 2000, v. 121, p. 239–250.
- Pertseva M.N. Involvement of adenylyl cyclase signaling mechanism in insulin and igf-I coregulation of fundamental cell processes. Ann. N.Y. Acad. Sci., 2005, v. 1040, p. 429–430.
- Pollack M., Phaneuf S., Dirks A. and Leeuwenburgh C. The role of apoptosis in the normal aging brain, skeletal muscle, and heart. Ann. N.Y. Acad. Sci., 2002, v. 959, p. 93–107.
- Puthier D., Thabard W., Rapp M. et al. Interferon alpha extends the survival of human myeloma cells through an upregulation of the Mcl-1 anti-apoptotic molecule. Br. J. Haematol., 2001, v. 112, p. 358–363.
- Schelman W.R., Andres R.D., Sipe K.J. et al. Glutamate mediates cell death and increases the Bax to Bcl-2 ratio in a differentiated neuronal cell line. Brain Res. Mol. Brain Res., 2004, v. 128, p. 160–169.
- Schindowski K., Leutner S., Muller W.E. and Eckert A. Age-related changes of apoptotic cell death in human lymphocytes. Neurobiol. Aging, 2000, v. 21, p. 661–670.
- Tseng Y.H., Ueki K., Kriauciunas K.M. and Kahn C.R. Differential roles of insulin receptor substrates in the anti-apoptotic function of insulin-like growth factor-1 and insulin. J. Biol. Chem., 2002, v. 277, p. 31601–31611.
- Ueno H., Kondo E., Yamamoto-Honda R. et al. Apoptosis related antigen, Le(Y) and nick-end labeling are positive in spinal motor neurons in amyotrophic lateral sclerosis. Acta Neuropathol. (Berl), 1994, v. 88, p. 207–211.
- Zhang Y., Chong E. and Herman B. Age-associated increases in the activity of multiple caspases in Fisher 344 rat organs. Exp. Gerontol., 2002, v. 37, p. 777–789.

Поступила в редакцию 27.04.2006 г.

Получена после доработки 26.05.2006 г.

CHANGES IN EXPRESSION OF APOPTOSIS-ASSOCIATED MOLECULES IN HYPOTHALAMIC NEUROSECRETORY CELLS OF MICE DURING AGING

Ye.D. Bazhanova, V.N. Molodtsov and K.I. Pavlov

The aim of work was to study the peculiarities of apoptosis regulation in neurosecretory centers of old (aged 18 months) mice treated with immunomodulator interferon alpha (IFN-alpha) as compared to young (aged 2 months) mice. It was shown that age-related apoptosis activation in supraoptic (SON) and paraventricular (PVN) nuclei was mediated by different molecular mechanisms and could result from the alterations of the balance of apoptosis-associated proteins, including the synthesis of proapoptotic (Bax) and antiapoptotic (Mcl-1, Bcl-2) molecules. Besides, the apoptosis signal cascade in young mice treated with IFN-alpha was identical in both nuclei, whereas in old mice there were some differences between SON and PVN.

Key words: neurosecretory cells, apoptosis, aging, interferon-alpha.

Laboratory of Comparative Somnology and Neuroendocrinology, RAS I.M. Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry, St. Petersburg; Graduate School of Biomedical Sciences-Stratford Division, University of Medicine and Dentistry of New Jersey, New Jersey, Stratford, USA; Department of Human Physiology, Russian A.I. Herzen State Pedagogical University, St. Petersburg.