

ИССЛЕДОВАНИЕ КАТЕХОЛАМИНСОДЕРЖАЩИХ СТРУКТУР ТИМУСА МЫШЕЙ ПРИ ВВЕДЕНИИ ХОРИОНИЧЕСКОГО ГОНАДОТРОПИНА

¹Гордова В.С., ²Ялалетдинова Л.Р., ²Ястребова С.А., ²Сергеева В.Е.

¹ФГАОУ ВО «Балтийский федеральный университет имени Иммануила Канта», г. Калининград

²ФГБОУ ВО «Чувашский государственный университет имени И.Н. Ульянова», Чебоксары, e-mail: crataegi@rambler.ru

Работа посвящена изучению гистохимических и иммуногистохимических характеристик тимуса мышей (n=100) после инъекций хорионического гонадотропина в течение 1, 2, 3, 4 недель в дозе 2 МЕ/мышь два раза в неделю. Для изучения процессов апоптоза использовались моноклональные антитела к белку p-53. Поступление гормона приводит к изменению морфологии тимусной дольки, пропорционально времени воздействия уменьшается содержание катехоламинов в клетках тимуса. Также пропорционально времени воздействия гормона увеличивается количество клеток, содержащих белок p-53 как в корковом, так и мозговом веществе долек тимуса. Обнаруженные нами изменения в первичном лимфоидном органе под влиянием хорионического гонадотропина позволяют ответить на некоторые вопросы о механизмах модулирования иммунного ответа с участием катехоловых аламинов.

Ключевые слова: тимус, катехоламины, хорионический гонадотропин.

THE STUDY OF CATECHOLAMINE CONTAINING STRUCTURES OF MURINE THYMUS TO THE INJECTION OF CHORIONIC GONADOTROPIN

Gordova V.S., Yalaletdinova L.R., Yastrebova S.A., Sergeeva V.E.

¹Immanuel Kant Baltic Federal University, Kaliningrad

²The Ulianov Chuvash State University, Cheboksary, e-mail: crataegi@rambler.ru

This work is dedicated to histochemical and immunohistochemical characteristics of the murine thymus (n=100) after the injection of chorionic gonadotropin during 1, 2, 3, 4 weeks with a dose of 2 IU/mouse twice a week. Monoclonal antibodies to protein p-53 to evaluate the apoptotic process were used. The admission of hormone leads to a change in the morphology of thymic lobules, decrease of catecholamines content in thymic cells according to the treatment time. Item quantity of protein p-53 containing cells both in medulla and cortex of thymic lobules increase according to the treatment time. Changes found in primary lymphoid organ under the influence of chorionic gonadotropin allow to get answers to some questions about mechanisms of immune response modulation with catecholamines involvement.

Keywords: thymus, catecholamines, chorionic gonadotropin.

Известно, что хорионический гонадотропин, являясь ключевым гормоном беременности, способен оказывать действие на иммунную систему на уровне предшественников зрелых Т-лимфоцитов [1], в результате этого происходит активация гуморального и подавление клеточного иммунного ответа. Так, в тимусе небеременных мышей при введении хорионического гонадотропина увеличивается количество Ki-67 позитивных клеток, что доказывает влияние этого гормона на пролиферативные процессы [2]. Вместе с тем торможение пролиферации и снижение числа митозов при ускорении дифференцировки лимфоцитов в тимусе наблюдается при выключении периферического отдела симпатической нервной системы [3]. Существует прямая зависимость морфофункционального состояния тимуса от активности симпатoadреналовой системы [4].

Тимус быстро и разнообразно реагирует на любые воздействия благодаря тому, что на лимфоцитах имеются рецепторы к катехоламинам [5].

Важную роль для различных стадий дифференцировки лимфоцитов играет ядерный белок р-53 – фактор транскрипции, который регулирует клеточный цикл и активирует белки, участвующие в репарации поврежденной ДНК. Если поврежденную ДНК восстановить невозможно, то белок р-53 запускает апоптоз [6], процессы которого, наряду с процессами пролиферации, являются основными механизмами, контролирующими иммунный гомеостаз. В связи с этим участие катехоламинов в процессах с участием белка р-53 при адаптации тимуса мышей к поступлению хорионического гонадотропина представляет определенный научный интерес.

Целью исследования явилось изучение морфологических, иммуногистохимических характеристик и катехоламинсодержащих структур тимуса мышей на фоне введения хорионического гонадотропина.

Материал и методы

Объектом исследования служил тимус 100 белых лабораторных небеременных четырехнедельных мышей-самок, содержащихся в условиях лабораторного вивария на стандартном рационе со свободным доступом к воде и корму. Животные были разделены на 3 группы: I – интактная группа (n=20); II – контрольная группа: внутримышечно вводили 0,02 мл физраствора (Люблинский фармацевтический завод, Польша) на животное 2 раза в неделю: II А – в течение одной недели (n=10); II Б – в течение двух недель (n=10); II В – в течение трех недель (n=10); II Г – в течение четырех недель (n=10); III – опытная группа: мышам вводили 2 Международных единицы (МЕ)/животное раствора хорионического гонадотропина (ФГУП «Московский эндокринологический завод», Россия), 2 раза в неделю: III А – в течение одной недели (n=10); III Б – в течение двух недель (n=10); III В – в течение трех недель (n=10); III Г – в течение четырех недель (n=10).

Дозировку гормона рассчитывали в зависимости от веса животных так, чтобы она была эквивалентна 500 МЕ – дозировке, применяемой в клинической практике. Все инъекции проводились с соблюдением правил асептики и антисептики. Процедуры по уходу за животными осуществляли согласно «Правилам проведения работ с использованием экспериментальных животных» («Приказ МЗ РФ от 19.06.2003 г. № 267») и в соответствии с «Европейской конвенцией о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях».

Тимус извлекался в одно и то же время суток с 16 до 18 часов, непосредственно после декапитации животных, часть органа замораживали для последующего приготовления криостатных срезов и постановки люминесцентно-гистохимических реакций, часть органа

фиксируют в 10 % растворе формалина с последующей заливкой в парафин и проведением иммуногистохимических реакций.

Люминесцентно-гистохимический метод Фалька – Хилларпа в модификации Е.М. Крохиной [7] применялся для выявления в тимусе адренергических нервных волокон и клеток, содержащих катехоламины. Криостатные срезы тимуса инкубировали в камере в парах формальдегида («Лабтех», Россия) в течение 60 минут при температуре 80 °С. Люминесцентный метод основан на реакции моноаминов с формальдегидом, в ходе которой образуются флуоресцирующие соединения. При этом происходит цепь химических реакций, в результате которых с начала катехоламины превращаются в 6,7-диокси-1,2,3,4-тетрагидроизохинолин и 4,6,7-триокси-1,2,3,4-тетрагидроизохинолин, а затем в процессе дегидрогенизации из них образуются флуоресцирующие соединения – 3,4-дигидроизохинолины. При просмотре препаратов под люминесцентным микроскопом с использованием запирающегося фильтра низкие концентрации флуоресцирующих соединений визуализируются изумрудно-зеленым цветом, высокие – желтым цветом. Микроскопия препаратов тимуса производилась под люминесцентным микроскопом при длине возбуждающего света 360 нм (люминесцентный микроскоп ЛЮМАМ-4А (ЛОМО, СССР).

Количественный уровень катехоламинов в тимусе определяли методом цитоспектрофлуориметрии с использованием люминесцентной фотометрической насадки ФМЭЛ-1А (ЛОМО, СССР) и выражали в условных единицах флуоресценции (усл. ед.).

Клетки, экспрессирующие белок p-53, выявляли иммуногистохимическим методом непрямого иммуноферментного анализа [8]. Применяли поликлональные антитела к белку апоптоза p-53 (Santa Cruze, США). Согласно протоколу производителя окрашивание проводили ручным и аппаратным способами с использованием иммуногистохимических автоконтейнеров AUTOSTAINER-360 (THERMO, Великобритания) и Leica BOND-MAX (Германия). Продукты иммунной реакции визуализировались при помощи стрептавидин-биотинового пероксидазного метода («Dako», LSAB+Kit,HRP), раствор диаминобензидина («Dako», Liquid DAB+) применяли в качестве красящего соединения.

Статистическая обработка полученного цифрового массива проводилась с помощью программы Microsoft Office Excel, оценка статистической значимости различий средних величин проводилась с применением критерия Манна – Уитни. Определяли значимость различий показателей контрольных (введение физраствора) и опытных групп (введение ХГ) между собой и по сравнению с интактной группой: * – различия с контрольной группой, $p < 0,05$; ** – различия с контрольной группой, $p < 0,001$; p_n – различия с интактной группой, $p_n < 0,05$ и $p_n <$

0,001. Средние значения (M) далее в тексте приведены со стандартной ошибкой среднего значения (m).

Результаты исследования. Люминесцентная микроскопия тимусной долишки мышей позволяет идентифицировать мозговое вещество (МВ), корковое вещество (КВ), границу между корковым и мозговым веществом. В корковом веществе долек тимуса и вокруг мозгового вещества долишки располагаются люминесцирующие гранулосодержащие клетки (ЛГК), при иммерсионном увеличении (x900) в них видны отдельные гранулы беловато-желтого цвета (рис. 1).

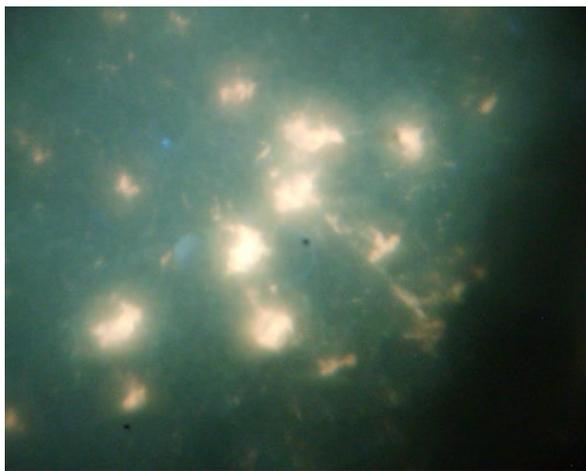


Рис. 1. Введение ХГ в течение четырех недель.

Катехоламинсодержащие клетки коркового вещества долек тимуса мыши.

Метод Фалька – Хилларна. Микроскоп ЛЮМАМ-4А. Об.40. Ок.10

Люминесцентная микроскопия выявляет в тимусе и тучные клетки [2]. Также определяются адренергические нервные волокна, проникающие в долишки тимуса в виде периваскулярных сплетений. Нервные окончания располагаются в корковом веществе долек тимуса в непосредственной близости с ЛГК между корковым и мозговым веществом и ЛГК коркового вещества, они имеют изумрудно-зеленый цвет.

Поступление в организм физиологического раствора на разных сроках эксперимента визуально не изменяет ни люминесцентно-морфологическую картину долек тимуса мышей, ни яркость свечения гранул в содержащих их клетках. В свою очередь, введение хорионического гонадотропина сопровождается появлением на границе коркового и мозгового вещества долек тимуса второго ряда люминесцирующих клеток – «удвоением» кортико-медуллярной границы, при этом визуально увеличивались размеры мозгового вещества, а гранулосодержащие клетки казались менее яркими.

Проведенная цитоспектрофлуориметрия показала, что введение гормона существенно изменяет интенсивность люминесценции катехоламинов в изучаемых структурах тимуса,

при этом для интактной группы и всех контрольных групп показатели были вполне сопоставимы (Таблица 1а, 1б). Данные таблицы показывают, что в подавляющем большинстве структур, содержащих катехоламины, на всех сроках введения гормона наблюдается снижение интенсивности их люминесценции.

Таблица 1а

Структуры тимуса	Интактная группа мышей (I)	Длительность опыта			
		1 неделя		2 недели	
		Группы мышей		Группы мышей	
		Ш А (ХГ)	П А (Физ. р-р)	Ш Б (ХГ)	П Б Физ. р-р
ЛГК на границе КВ и МВ	8,80±2,59	3,60±0,13** p _и < 0,001	8,10±0,24	4,83±1,92** p _и < 0,001	8,45±1,34
ЛГК КВ долек	7,84±1,38	3,59±0,18** p _и < 0,001	7,15±0,36	6,27±2,43** p _и < 0,001	7,50±2,08
Лимфоциты МВ долек	8,67±2,69	3,47± 0,12** p _и < 0,001	8,20±0,18	8,25±0,24** p _и < 0,001	8,45±1,06
Лимфоциты КВ долек	9,90±0,55	3,81± 0,27* p _и < 0,001	9,55±0,46	5,29±2,09** p _и < 0,001	9,35±0,78
Адренергические нервы	6,90±0,86	5,95±2,00*	6,40±1,51	7,90±1,11*	6,70±2,99

Интенсивность люминесценции катехоламинов в структурах тимуса мышей
(усл. ед. $\times 10^2$, $M \pm m$) при введении хорионического гонадотропина (ХГ)

Примечание:

* $p < 0,05$; ** $p < 0,001$ – уровень достоверности различий по отношению к контрольной группе мышей;

p_и < 0,05; p_и < 0,001 – уровень достоверности различий по отношению к интактной группе мышей.

Таблица 1b

Структуры тимуса	Интактная группа мышей (I)	Длительность опыта			
		3 недели		4 недели	
		Группы мышей		Группы мышей	
		Ш А (ХГ)	П А (Физ. р-р)	Ш Б (ХГ)	П Б (Физ. р-р)
ЛГК на границе КВ и МВ	8,80±2,59	2,73±0,9**	8,70± 0,75	3,49± 0,07 $p_{и}<0,05$	7,85±0,67
ЛГК КВ долек	7,84±1,38	2,49±0,79**	7,00±0,75	3,49±0,11	7,20±0,73
Лимфоциты МВ долек	8,67±2,69	2,88±0,73** $p_{и}<0,001$	8,75±0,28	3,52±0,08 $p_{и}<0,001$	8,55±0,97
Лимфоциты КВ долек	9,90±0,55	3,25±0,07** $p_{и}<0,05$	9,60±0,22	3,54±0,07** $p_{и}<0,001$	9,60±0,73
Адренергические нервы	6,90±0,86	3,45±0,93* $p_{и}<0,001$	5,90±0,29	2,80±1,39 $p_{и}<0,001$	5,87±0,88

Интенсивность люминесценции катехоламинов в структурах тимуса мышей (усл. ед. $\times 10^2$, $M \pm m$) при введении хорионического гонадотропина (ХГ)

Примечание:

* $p < 0,05$; ** $p < 0,001$ – уровень достоверности различий по отношению к контрольной группе мышей;

$p_{и} < 0,05$; $p_{и} < 0,001$ – уровень достоверности различий по отношению к интактной группе мышей.

Иммуногистохимическая реакция с использованием антител к маркеру апоптоза белку p-53 позволила нам выявить клетки с коричневой окраской цитоплазмы и цитоплазматической мембраны разной степени интенсивности в корковом и мозговом веществах долек тимуса и произвести их подсчет (рис. 2, таблица 2).

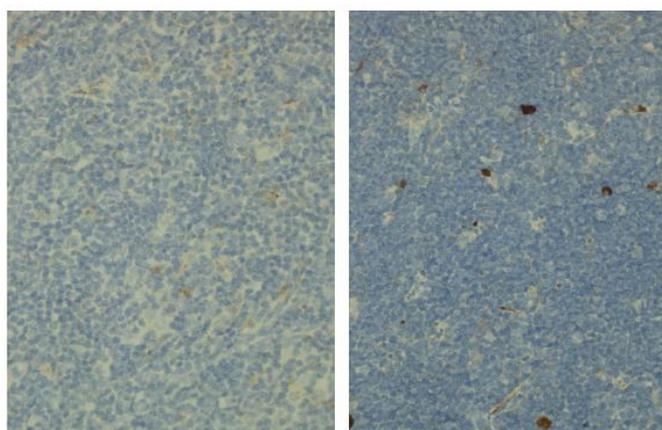


Рис. 2. Позитивная реакция на белок p-53 в клетках мозгового (слева) и коркового (справа) вещества долек тимуса мыши. Клетки, содержащие белок p-53, имеют коричневую окраску.

Микроскоп Leica DM4000B. Об.40. Ок.10

Таблица 2

Количество клеток, содержащих белок p-53, в поле зрения в морфофункциональных зонах долек тимуса экспериментальных мышей, шт.

Группы мышей	Корковое вещество долек		Мозговое вещество долек	
	Интактные	Получавшие ХГ	Интактные	Получавшие ХГ
1 неделя	4,0±0,5	3,6±0,5	0	0
2 недели	3,0±0,3	12,0±0,9*	0	6,7±0,4
3 недели	4,0±0,6	18,2±0,8*	0	3,6±0,3
4 недели	4,0±0,4	25,2±1,3**	0	2,5±0,2

* – различия с интактной группой статистически значимы, $p < 0,05$;

** – различия с интактной группой статистически значимы, $p < 0,001$.

Данные таблицы свидетельствуют о том, что имеет место прямая зависимость между длительностью введения хорионического гонадотропина и увеличением количества клеток, содержащих белок p-53 в корковом веществе долек тимуса мышей. Кроме того, обращает на себя внимание появление клеток, содержащих белок p-53, в мозговом веществе долек тимуса мышей, получавших гормон.

Обсуждение полученных данных. Поступление хорионического гонадотропина приводит к увеличению экспрессии белка p-53 в клетках коркового вещества долек тимуса прямо пропорционально длительности воздействия. На протяжении всего срока эксперимента интенсивность люминесценции катехоламинов в структурах тимусной дольки мышей опытных групп снижена по сравнению с интактными животными, что может свидетельствовать о возможном участии нейромедиаторных биогенных аминов, в частности катехоламинов, в процессах апоптоза в клетках тимуса мышей при действии хорионического гонадотропина. Результаты нашего исследования хорошо согласуются с имеющимися литературными данными. Так, обнаружена прямая связь между катехоламинергической иннервацией и экспрессией белков апоптоза: просходит усиление синтеза белка p-53 при обеднении иннервации в нейронах гипоталамуса [9]. Роль рецепторов к адреналину в развитии CD4⁺ лимфоцитов подчеркивается в работе W. N. Kin, V. M. Sanders [5]. Моделирование иммунного ответа *in vitro* показывает, что при добавлении в среды культивирования норадреналина наблюдается максимальное приближение результатов опытов к процессам, происходящим в живом организме. Роль катехоламинов в

микроокружении лимфоцитов в становлении и развитии иммунного ответа рассмотрена и М. А. Самотруевой и соавторов [10]. В то же время литературный обзор, посвященный медиаторам стресса матери и плода во время беременности, свидетельствует, что стресс обеспечивается многими синергетическими механизмами передачи, к которым, наряду с кортизолом, можно отнести катехоламины, серотонин, цитокины и материнскую микрофлору [11]. Заслуживает внимания публикация, в которой роль катехоламинов в процессе влияния материнского стресса на развитие плода выделяется в качестве самостоятельной научной проблемы [12]. Проведенные нами исследования дают основание предположить, что, хорионический гонадотропин, изменяя выделение катехоламинов из периферических нервных волокон и тучных клеток, наряду с иммуномодулирующей функцией, наблюдаемой нами в тимусе лабораторных мышей, осуществляет еще и другую функцию – снижает для плода риск от возможных негативных последствий стресса, которым является для материнского организма беременность.

Заключение

Введение хорионического гонадотропина на всех сроках воздействия приводит к уменьшению интенсивности люминесценции в подавляющем большинстве катехоламинсодержащих структур тимуса лабораторных мышей. При этом в корковом веществе долек тимуса имеет место прямая зависимость между длительностью введения хорионического гонадотропина и увеличением количества клеток, содержащих белок p-53.

Список литературы

1. Заморина С.А. Хорионический гонадотропин – фактор индукции иммунной толерантности при беременности / С.А. Заморина, С.В. Ширшев // Иммунология. – 2013. – Т. 34, № 2. – С. 105–107.
2. Ялалетдинова Л.Р. Морфологическая характеристика тимуса небеременных мышей при введении хорионического гонадотропина / Л.Р. Ялалетдинова, В.С. Гордова, С.А. Ястребова, В.Е. Сергеева // Acta medica Eurasica. – 2016. – № 3. – С. 59-65.
3. Ажипа Я.И. Нервы желез внутренней секреции и медиаторы в регуляции эндокринных функций / Я.И. Ажипа. – М.: Наука, 1976. – 438 с.
4. Elenkov I.J. The sympathetic nerve an integrative interface between two supersystems: the brain and the immune system / I.J. Elenkov, R.L. Wilder, G.P. Chrousos, E.S. Vizv // Pharmacol. Rev. – 2000. – Vol. 52. – P. 595–638.
5. Kin N. W. It takes nerve to tell T and B cells what to do / W. N. Kin, V. M. Sanders // Journal of Leukocyte Biology. – 2006. – Vol. 79. – P. 1093-1104.

6. Чумаков П.М. Белок p53 и его универсальные функции в многоклеточном организме / П.М. Чумаков // Успехи биологической химии. – 2007. – Т. 47. – С. 3–52.
7. Ялалетдинова, Л.Р. Содержание нейромедиаторных биогенных аминов в тучных клетках тимуса при длительном введении хорионического гонадотропина небеременным крысам лабораторных мышей / Л.Р. Ялалетдинова, В.С. Гордова, В.Е. Сергеева // Перинатальная медицина настоящее и будущее: сборник материалов межрегиональной научно-практической конференции по актуальным вопросам перинатальной медицины и репродуктивного здоровья населения / МЗ ЧР; ФГБОУ ВО ЧГУ им. И.Н. Ульянова. – Чебоксары. – 2016. – С. 88–90.
8. Иммуногистохимические методы: руководство / Ed. By George L. Kumar, Lars Rudbeck; ДАКО: перевод с англ. / под ред. Г.А. Франка, П.Г. Малькова. – М., 2011. – 224 с.
9. Анисимов В.Н. Молекулярные и физиологические механизмы старения / В.Н. Анисимов: в 2 т. – 2-е изд., перераб. и доп. – Санкт-Петербург: Наука, 2008. – Т. 1. – 481 с.
10. Самотруева М.А. Пути реализации нейро-иммунно-эндокринных взаимодействий / М.А. Самотруева, Д.Л. Теплый, И.Н. Тюренков // Естественные науки. – 2009. – № 4 (29). – С. 112–130.
11. Rakers F. Transfer of maternal psychosocial stress to the fetus. / F. Rakers, S. Rupperecht, M. Dreiling, C. Bergmeier et al. // *Neurosci Biobehav Rev.* 2017 Feb 22. pii: S0149-7634(16)30719-9. doi: 10.1016/j.neubiorev.2017.02.019.
12. Rakers F. Role of catecholamines in maternal-fetal stress transfer in sheep. / F. Rakers, Bischoff S, Schiffner R, Haase M. et al. // *Am J Obstet Gynecol.* – 2015. – Nov. 213(5). – P.684.e1-9. doi: 10.1016/j.ajog.2015.07.020.