

МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА СЕРОТОНИНСОДЕРЖАЩИХ СТРУКТУР ТИМУСА ПРИ ВВЕДЕНИИ ХОРИОНИЧЕСКОГО ГОНАДОТРОПИНА

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

¹ФГБОУ ВО «Чувашский государственный университет имени И.Н. Ульянова», Чебоксары, e-mail: yastrebova2501@gmail.com;

²ФГАОУ ВО «Балтийский федеральный университет им. И. Канта», Калининград, e-mail: crataegi@rambler.ru

Хорионический гонадотропин является одним из гормонов, принимающих участие в регуляции физиологического равновесия между клеточным и гуморальным звеньями адаптивного иммунного ответа в женском организме во время беременности. Однако он способен влиять на некоторые процессы в тимусе с участием нейромедиаторных биогенных аминов и при отсутствии беременности. С помощью люминесцентно-гистохимического метода Фалька–Хилларпа исследован тимус небеременных мышей (n=100) при внутримышечном введении хорионического гонадотропина в течение 1, 2, 3, 4 недель в дозе 2МЕ/мышь два раза в неделю. Люминесцирующими клетками, содержащими серотонин, являются клетки коркового вещества долек тимуса, клетки на границе между корковым и мозговым веществом. Также серотонин обнаруживается в нервных терминалах. На всех сроках исследования в нервных терминалах и клетках, содержащих серотонин, определено уменьшение интенсивности его люминесценции. Максимальное снижение наблюдается в первую неделю поступления хорионического гонадотропина во всех серотонинсодержащих структурах коркового и мозгового вещества долек тимуса. Полученные данные хорошо согласуются с изменениями в популяции тучных клеток тимуса, содержанием в клетках и нервных терминалах катехоловых аминов, экспрессией в корковом и мозговом веществе тимуса маркера пролиферации Ki-67.

Ключевые слова: тимус, серотонин, хорионический гонадотропин.

MORPHO-FUNCTIONAL CHARACTERISTICS OF THE SEROTONIN CONTAINING THYMIC STRUCTURES DURING INJECTIONS OF CHORIONIC GONADOTROPIN

Yastrebova S. A.¹, Jalaletdinova L. R.¹, Gordova V. S.², Sergeeva V. E.¹

¹The Ulianov Chuvash State University, Cheboksary, e-mail: yastrebova2501@gmail.com;

²Immanuel Kant Baltic State University, Kaliningrad, e-mail: crataegi@rambler.ru

Chorionic gonadotropin is one of the hormones involved in the regulation of the physiological balance between the cellular and humoral links of the adaptive immune response in the female body during pregnancy. However, it is able to influence some processes in the thymus involving neurotransmitter biogenic amines during the absence of pregnancy too. Thymus of non-pregnant mice (n=100) after the injection of chorionic gonadotropin during 1, 2, 3, 4 weeks with a dose of 2 IU/mouse twice a week was investigated by the luminescent-histochemical method of Falck-Hillarp. Serotonin containing, cells are the cells of the cortical substance of the lobules of the thymus, cells on the border between the cortical and medullar substance of thymic lobules. Serotonin is also founded in nerve terminals. During all the time of the study in nerve terminals and cells containing serotonin, a decrease in the intensity of its luminescence was found. The maximal level of serotonin decreasing was registrated during the first week of chorionic gonadotropin injection in all serotonin-containing structures of the cortical and brain medullar substance of the thymic lobules. The data obtained are in good agreement with the changes in the mast cells population of the thymus, the content of catecholamines in cells and nerve terminals, the expression of Ki-67 proliferation marker in the cortex and medullar substance of thymic lobules.

Keywords: thymus, serotonin, chorionic gonadotropin.

Одним из гормонов, принимающих участие в регуляции физиологического равновесия между клеточным и гуморальным звеньями адаптивного иммунного ответа, является хорионический гонадотропин. Он выделяется ворсинчатым хорионом, и в зависимости от стадии развития плаценты его концентрация в крови и моче беременной изменяется, нарастая со сроком беременности [1]. Кроме того, этот гормон обладает выраженным действием на организм и в отсутствие беременности, в частности изменяет

морфологию тимуса и распределение в нем иммунокомпетентных клеток [2]. При этом претерпевает изменение адренергическая иннервация тимуса, содержание катехоловых аминов в тучных клетках и нервных волокнах зависит от сроков поступления хорионического гонадотропина в организм небеременных мышей. Катехоловые амины являются теми сигнальными молекулами, действие которых сходно для человека и животных в процессах онтогенеза нейроэндокринной и иммунной систем [3]. Еще одним биогенным амином, принимающим участие в нейроиммуноэндокринных взаимодействиях, является серотонин, подтипы рецепторов которого широко представлены на иммунокомпетентных клетках [4]. В связи с этим интересно проследить наличие связей между содержанием катехоловых аминов и серотонина в одних и тех же тимусных структурах при поступлении в организм хорионического гонадотропина.

Целью нашей работы явилось изучение серотонинсодержащих структур тимуса мышей при введении хорионического гонадотропина в зависимости от сроков поступления.

Материал и методы исследования

Серотонин выявляли в тимусе 100 самок белых нелинейных мышей в отсутствие беременности, мыши содержались в условиях вивария, при естественном освещении, на стандартном сбалансированном рационе со свободным доступом к воде и корму. Были сформированы несколько экспериментальных групп: I – интактная (n=20) – мыши, не подвергавшиеся воздействию; II – контрольная – мыши, получавшие дважды в неделю 0,02 мл физиологического раствора (Люблинский фармацевтический завод, Польша) внутримышечно (II А – одну неделю (n=10), II Б – две недели (n=10); II В – три недели (n=10); II Г – четыре недели (n=10)); III – подопытная – мыши, получавшие инъекции раствора хорионического гонадотропина (ФГУП «Московский эндокринологический завод», Россия) по 2 Международные единицы (МЕ)/мышь дважды в неделю (III А – одна неделя (n=10); III Б – две недели (n=10); III В – три недели (n=10); III Г – четыре недели (n=10)). Дозировка гормона рассчитывалась таким образом, чтобы в зависимости от веса мышей она была эквивалентна 500 МЕ (той дозировке, которая применяется в клинической практике).

Тимус извлекали непосредственно после декапитации, орган замораживали, готовили криостатные срезы для постановки люминесцентно-гистохимических реакций.

Для выявления серотонина в содержащих его структурах нами был выбран люминесцентно-гистохимический метод Фалька–Хилларпа в модификации Е.М. Крохиной, хорошо зарекомендовавший себя в комплексных исследованиях при изучении лимфоидных органов [5].

Суть этого метода заключается в том, что после пребывания свежих криостатных срезов, высушенных на воздухе, в парах формальдегида, выдержанного в термостате при

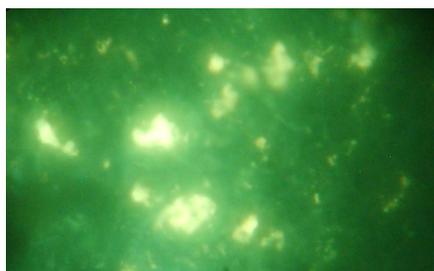
температуре 80°C в течение 1 часа, серотонин, содержащийся в тканях, преобразуется в карболины, которые флуоресцируют в зависимости от количественного содержания серотонина разными оттенками желтого. Для идентификации и количественного выражения содержания серотонина в структурах тимуса использовали метод цитоспектрофлуориметрии. На люминесцентный микроскоп ЛЮМАМ-4А (ЛОМО, СССР) устанавливали дополнительную насадку ФМЭЛ-1А (ЛОМО, СССР) с выходным напряжением 900 В, использовали светофильтр № 8 с длиной волны 360 нм. Показания снимали с табло усилителя У-5 в условных единицах флуоресценции (милливольты).

Для того чтобы морфологические выборки люминесцирующих структур были репрезентативными, их производили случайным отбором, в каждом срезе измеряли интенсивность люминесценции в клетках, нервных терминалях и в их микроокружении в пяти случайных полях зрения, в 20 клетках на каждое поле зрения, затем вычисляли среднее арифметическое значение интенсивности люминесценции серотонина по каждой структуре для каждой морфофункциональной зоны как по отдельно взятой мышце, так и в группе; для всех средних рассчитывалась стандартная ошибка среднего значения (m). При обработке цифрового массива и проведении анализа различий между реакциями структур мышцей, получавших и не получавших хорионический гонадотропин, проводили проверку вариационных рядов на нормальность распределения. Если гипотеза о нормальности распределения не подтверждалась, использовали непараметрические критерии Вилкоксона–Манна–Уитни; если подтверждалась, то статистическую значимость различий средних величин рассчитывали с помощью программы Microsoft Office Excel через статистические методы ТТЕСТ, при установке хвосты = 2 (использовалось двустороннее распределение), тип = 3 (для неравных отклонений). Различия считали статистически значимыми при значениях $p \leq 0,05$. Далее в тексте значимость различий обозначается так: * – различия с контрольной группой, $p < 0,05$; ** – различия с контрольной группой, $p < 0,001$; p_{in} – различия с интактной группой, $p < 0,05$ и $p < 0,001$. Средние значения (M) приводятся со стандартной ошибкой среднего значения (m).

Результаты исследования и обсуждение

Люминесцентная гистохимия позволяет выявить в тимусе мышцей определенным образом расположенные люминесцирующие гранулосодержащие клетки (ЛГК), это расположение определяет морфофункциональные зоны: корковое и мозговое вещество долек тимуса. В корковом веществе долек тимуса ЛГК располагаются диффузно, их максимальная концентрация наблюдается на участках, прилежащих к междольковым корковым перегородкам. У интактных мышцей и мышцей, получавших физиологический раствор на разных сроках эксперимента, граница между корковым и мозговым веществом долек тимуса

представлена одним рядом близко расположенных ЛГК, которые образуют своего рода границу (см. рисунок). ЛГК характеризуются наличием люминесцирующих гранул светлых оттенков желтого цвета, различных по величине и интенсивности свечения. В микроокружении ЛГК наблюдается зона диффузного свечения, причем визуально эта зона более выражена в ЛГК коркового вещества долек тимуса. Среди ЛГК тимуса можно выделить клетки с характерными равномерно расположенными округлыми субтильными гранулами, которые согласно морфологическим характеристикам можно отнести к тучным клеткам. Близко от них обнаруживаются терминальные окончания нервных волокон, имеющих зеленоватый оттенок.



Тимус интактной мыши. Люминесцирующие гранулосодержащие клетки на границе между корковым и мозговым веществом дольки. Слева от полуовальной зоны – корковое вещество, справа – мозговое вещество. Метод Фалька–Хилларна. Микроскоп ЛЮМАМ-4А. Ув. x400

Поступление хорионического гонадотропина изменяет люминесцентную морфологию тимуса, что выражается в изменении количества клеток на границе коркового и мозгового вещества долек тимуса, появлении второго слоя люминесцирующей зоны. Одновременно с этим корковое вещество долек тимуса начинает визуализироваться более ярко, а ЛГК, напротив, теряют свою яркость, отдельные гранулы в них становятся неразличимы. Визуальная картина полностью подтверждается результатами проведенной цитоспектрофлуориметрии, выявившей снижение интенсивности люминесценции серотонина в структурах исследуемого органа (табл. 1,2).

Данные таблиц показывают, что интенсивность люминесценции серотонина в клетках и нервных терминалах долек тимуса мышей не зависит от введения физиологического раствора на всех сроках эксперимента, в то время как введение хорионического гонадотропина заметно меняет содержание серотонина в этих структурах по сравнению с интактной группой животных. Обращает на себя внимание тот факт, что изначальная концентрация серотонина в нервных терминалах долек тимуса существенно ниже концентрации его в клетках и их микроокружении, что наводит на мысль о том, что нервные терминалы, вероятно, не играют ведущей роли в снабжении серотонином лимфоцитов, находящихся в микроокружении ЛГК. Эта мысль подкрепляется нашими предыдущими

исследованиями, касающимися тучных клеток при введении хорионического гонадотропина.

Таблица 1

Интенсивность люминесценции серотонина в структурах тимуса мышей интактной, контрольных и опытных групп, в усл. ед., $\times 10^2$ ($M \pm m$)

Структура тимуса	Группы экспериментальных мышей				
	Сроки опытов	1 неделя		2 недели	
		Интактные	ХГ	Физ. р-р	ХГ
ЛГК на границе КВ и МВ долек	7,25±2,5	3,59±0,1 $P_n < 0,001$	7,80±0,1	7,23±2,2** $P_n < 0,001$	7,85±1,7
ЛГК КВ долек	7,06±1,4	3,60±0,1** $P < 0,001$	7,35±0,8	6,25±2,7** $P_n < 0,05$	6,85±2,7
Микроокружение ГЛК на границе КВ и МВ долек	8,23±1,6	3,42±0,1** $P_n < 0,001$	8,10±0,1	9,08±2,6 $P_n < 0,001$	7,95± 0,52
Микроокружение ГЛК КВ долек	9,4±0,30	3,73±0,2*	9,15±0,6	4,50±1,2**	8,85±0,3
Нервные терминалы	4,75±1,4	1,70±0,4** $P_n < 0,001$	4,75±0,5	4,5±0,46	4,85±1,4

* – различия с контрольной группой статистически значимы, $P_n < 0,05$;

** – различия с контрольной группой статистически значимы, $P_n < 0,001$;

P_n – различия с интактной группой статистически значимы, $P_n < 0,05$ и $P_n < 0,001$.

Интересно сопоставить интенсивность люминесценции серотонина с данными, касающимися пролиферативной активности лимфоцитов в корковом и мозговом веществе долек тимуса на этих же сроках введения гонадотропина, представленной нами в предыдущих работах [6]. Так, по сравнению с интактными животными на первой неделе среднее количество клеток, экспрессирующих маркер пролиферации Ki-67, увеличивается в 1,5 раза как в корковом, так и в мозговом веществе долек тимуса, и этот пик совпадает с минимальной интенсивностью люминесценции серотонина в его клетках.

Таблица 2

Интенсивность люминесценции серотонина в структурах тимуса мышей интактной, контрольных и опытных групп, в усл. ед., $\times 10^2$ ($M \pm m$)

Структура	Группы экспериментальных мышей
-----------	--------------------------------

тимуса	Сроки опытов	3 недели		4 недели	
		Интак- тные	ХГ	Физ. р-р	ХГ
ЛГК на границе КВ и МВ долек	7,25±2,5	3,65±0,9** P _и < 0,05	7,90±0,5	3,43±0,06 P _и < 0,05	7,05±0,9
ЛГК КВ долек	7,06±1,4	2,460±0,8** P _и < 0,05	7,00±0,6	3,47±0,08 P _и < 0,05	7,05±0,9
Микроокружение ГЛК на границе КВ и МВ долек	8,23±1,6	2,85±0,7**	7,20±0,1	3,43±0,1 P _и < 0,001	7,40± 6,5
Микроокружение ГЛК КВ долек	9,4±0,3	3,12±0,04** P _и < 0,001	8,89±0,2	3,41±0,06** P _и < 0,001	8,15±0,4
Нервные терминалы	4,75±1,4	2,20±0,3** P _и < 0,05	4,95±0,2	2,20±0,6 P _и < 0,05	4,45±0,8

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

** – различия с контрольной группой статистически значимы, $p < 0,001$;

p_и – различия с интактной группой статистически значимы, $p < 0,05$ и $p < 0,001$.

В течение последующих трех недель количество Ki-67 экспрессирующих клеток постепенно снижается пропорционально сроку воздействия, достигая к четырем неделям половинных показателей по сравнению с животными интактной группы. Согласно литературным данным производные аминокислот (такие как гистамин, серотонин, адреналин) стимулируют фагоцитоз у многоклеточных животных, в то время как хорионический гонадотропин оказывает отрицательное влияние на этот процесс [6]. Можно предположить, что увеличение пролиферативной активности лимфоцитов связано с уменьшением захвата лимфоцитов макрофагами тимуса, к которым и относятся люминесцирующие гранулярные клетки коркового вещества долек тимуса. Итак, первую неделю поступления в организм хорионического гонадотропина можно считать временем проявления всех его эффектов, в том числе и снижения фагоцитарной активности макрофагов в тимусе, которая впоследствии не только «выправляется», но и сменяется на противоположную. Имеются сообщения, что серотонин и белок Ki67 могут быть маркерами одних и тех же процессов, например нейроэндокринных бронхопульмональных и тимических опухолей [7].

Начиная со второй недели в корковом веществе долек тимуса пропорционально сроку

воздействия начинает возрастать количество клеток, содержащих маркер апоптоза p-53. Примечательно, что результаты по изменению интенсивности серотонина очень сходны с таковыми, касающимися катехоловых аминов при воздействии на организм хорионического гонадотропина, при этом максимальные пики снижения интенсивности люминесценции наблюдаются на первой и третьей неделе воздействия. Изменения, касающиеся катехоловых аминов и серотонина в структурах тимуса под воздействием хорионического гонадотропина, сходны. Это можно объяснить тем, что в условиях беременности выделяемый плацентой гормон с ранних сроков способен снижать в материнском организме стресс, медиаторами которого, помимо кортизола, являются катехоловые амины, серотонин, цитокины и микрофлора материнского организма [8]. Получается, что серотониновая система чувствительна к поступлению хорионического гонадотропина, и она принимает участие в обеспечении тонких настроек адаптации организма.

Таким образом, проведенное нами исследование показывает, что при поступлении в организм мышей хорионический гонадотропин способен изменять концентрацию серотонина в структурах тимуса; это дает основание предположить, что гормон задействует серотонинзависимые процессы для иммуномодуляции и снижения возможных проявлений стресса на организм самок во время беременности.

Список литературы

1. Bansal A.S., Bora S.A., Saso S., Smith J.R., Johnson M.R., Thum M.Y. Mechanism of Human Chorionic Gonadotrophin-mediated Immunomodulation in Pregnancy. *Expert Rev. Clin. Immunol.* 2012. vol. 8. no. 8. P. 747-753.
2. Ялалетдинова, Л.Р., Гордова В.С., Ястребова С.А., Сергеева В.Е. Морфологическая характеристика тимуса небеременных мышей при введении хорионического гонадотропина // *Acta medica Eurasica.* 2016. № 3. С. 59-65.
3. Paltsev M.A., Polyakova V.O., Kvetnoy I.O., Anderson G., Kvetnaia T.V., Linkova N.S., Paltseva E.M., Rubino R., De Cosmo S., De Cata A., and Gianluigi Mazzoccoli G. Morphofunctional and signaling molecules overlap of the pineal gland and thymus: role and significance in aging *Oncotarget.* 2016. № 7. P. 11972-11983. DOI: 10.18632/oncotarget.7863.
4. Гордова В.С., Карышев П.Б., Сапожников С.П., Сергеева В.Е. Серотониновый статус селезенки крыс при изолированном и сочетанном поступлении водорастворимых соединений кремния // *Наука и инновации – 2015: материалы десятой Международной научной школы (Йошкар-Ола, 03-12 июля 2015 г.). Йошкар-Ола, 2015. С. 190-194.*
5. Сергеева В.Е., Гордова В.С., Гордон Д.С. Люминесцентная гистохимия биогенных

аминов в морфо-функциональном состоянии органов и тканей в эксперименте (научно-исторический обзор) // Acta medica Eurasica. 2017. № 3 С. 30-49.

6. Csaba G. Is there a hormonal regulation of phagocytosis at unicellular and multicellular levels? A critical review. Acta. Microbiol. Immunol. Hung. 2017. V.64(4). P. 357-372. DOI: 10.1556/030.64.2017.024.

7. Делекторская В.В. Нейроэндокринные опухоли бронхопульмональной системы и тимуса: морфологические аспекты диагностики // Альманах клинической медицины. 2015. № 41. С. 89-96.

8. Rakers F., Rupprecht S., Dreiling M., Bergmeier C., Witte O.W., Schwab M. Transfer of maternal psychosocial stress to the fetus. Neurosci Biobehav Rev. 2017. Feb 22. P. S0149-7634(16)30719-9. DOI: 10.1016/j.neubiorev.2017.02.019.