

И.Л. Сарилова, В.Е. Сергеева и Т.Л. Смирнова

РАСПРЕДЕЛЕНИЕ SP-СОДЕРЖАЩИХ СТРУКТУР И АНТИГЕНПРЕДСТАВЛЯЮЩИХ КЛЕТОК В ТИМУСЕ САМЦОВ КРЫСЫ ПОСЛЕ ГОНАДЭКТОМИИ

Кафедра медицинской биологии (зав. — проф. С.П. Сапожников) Чувашского государственного университета, г. Чебоксары

На самцах крыс линии Вистар изучено распределение SP-позитивных структур в тимусе и их связь с антигенпредставляющими клетками в норме и при недостаточности в организме мужских половых гормонов (гонадэктомия). Применен иммуногистохимический метод непрямого иммунофлюоресцентного анализа с использованием антител к белкам главного комплекса гистосовместимости II класса МНС-II (маркер антигенпредставляющих клеток) и антител к веществу P(SP). Установлено, что популяции антигенпредставляющих (МНС-II-экспрессирующих) клеток и SP-позитивные структуры тимуса контактируют между собой. Гонадэктомия приводит к увеличению количества антигенпредставляющих клеток в мозговом и корковом веществе и уменьшению количества SP-позитивных клеток во всех зонах долек тимуса. Результаты исследования демонстрируют наличие тесного сотрудничества между эндокринной, нейропептидной и иммунокомпетентной системами.

Ключевые слова: тимус, антигенпредставляющие клетки, вещество P (SP), гонадэктомия.

Нейроэндокринная иммуномодуляция, включающая нейроны и нейроэндокринные медиаторы, играет важную роль в поддержании гомеостаза [1, 13]. Тимус является органом, в котором наиболее отчетливо проявляются тесные молекулярные и клеточные нейроиммуноэндокринные взаимодействия, что обусловлено наличием в нем особых клеток, вырабатывающих либо экспрессирующих рецепторы практически всех известных гормонов, нейромедиаторов и нейропептидов.

Важную роль посредников во взаимодействиях иммунной и нейроэндокринной систем выполняют макрофаги и дендритные клетки (ДК), способные секретировать ключевые иммунорегуляторные факторы. Макрофаги, ДК и В-лимфоциты относятся к антигенпредставляющим клеткам (АПК), объединенным в эту группу благодаря способности экспрессировать на своей поверхности белки главного комплекса гистосовместимости II класса (МНС-II) [4]. За последние годы накопилось большое количество сведений о важной роли АПК тимуса, являющихся одним из компонентов микроокружения тимоцитов и активно участвующих в процессах их развития и дифференцировки [6]. Тимусные АПК ответственны за позитивную и негативную селекцию Т-лимфоцитов, в ходе которых происходит взаимодействие между Т-клеточными рецепторами и молекулами МНС-комплекса. Кроме молекул МНС-II, на АПК экспрессируются все необходимые корцепторные молекулы и цитокины, необходимые для активации Т-лимфоцита к иммунному ответу.

Нейропептиды, широко представленные в тимусе, выполняют роль регуляторов разнообразных

физиологических функций и принимают активное участие в нейроиммуноэндокринных взаимодействиях. Одним из них является вещество P (Substance P, SP). Известно, что SP обладает широким спектром физиологической активности: индуцирует синтез провоспалительных медиаторов (интерлейкина-1, фактора некроза опухоли и др.), усиливает действие брадикинина, гистамина, серотонина, стимулирует выброс вазоактивного кишечинального пептида и фактора роста нервов тучными клетками, повышает фагоцитоз [11]. SP участвует в стимуляции клеточного и гуморального иммунитета, увеличивая синтез ДНК и протеинов и усиливая пролиферацию Т-лимфоцитов, активирует макрофаги, тучные клетки и нейтрофильные гранулоциты, а также подавляет апоптоз тимоцитов, вызванный глюкокортикоидами [7]. Экспрессия SP и его рецепторы описаны в эпителиоретикулоцитах (тимусных эпителиальных клетках — ТЭК) и тимоцитах птиц, на Т- и В-лимфоцитах человека [17].

При изучении влияния мужских половых гормонов на иммунные процессы получены разноречивые результаты [8, 10]. Согласно одним данным, введение тестостерона в организм или в клеточные культуры угнетающе действует на иммунные процессы, подавляя активность Т-лимфоцитов. С другой стороны, известно, что введение андрогенов приводит к существенному повышению количества антителообразующих клеток в селезенке у крыс, в то время как пролиферативная активность Т-, но не В-клеток, существенно снижается. Активация Т-супрессоров обнаружена в условиях введения тестостерона *in vivo* у крыс. Изменяя

активацию протеинкиназы С, андрогены снижают секреторную активность ТЭК, подавляют их дифференцировку и пролиферацию [16].

Учитывая совокупность приведенных данных, нами на экспериментальной модели недостаточности мужских половых гормонов в организме, вызванной гонадэктомией (ГЭ), изучено влияние этих гормонов на процессы, протекающие в структурах, составляющих микроокружение тимоцитов в центральном органе иммунитета — тимусе.

Цель настоящей работы — изучить распределение SP-позитивных структур в тимусе и их связь с АПК в норме и после ГЭ.

Материал и методы. Эксперименты выполнены на 30 половозрелых самцах крыс линии Вистар в возрасте 2–3 мес и массой 150 г, содержащихся в стандартных условиях вивария при сбалансированном рационе питания. Все процедуры в работе с крысами осуществляли согласно нормам и правилам обращения с лабораторными животными. Экспериментальные животные были разделены на 2 группы: 1-я — контрольная группа (интактные крысы), $n=20$; 2-я — опытная, $n=20$, которым проводили ГЭ. Тимус извлекали под глубоким эфирным наркозом через 30 сут после ГЭ. Криостатные срезы тимуса толщиной 15 мкм обрабатывали непрямой иммунофлюоресцентным методом. Блокирование неспецифического связывания проводили преинкубацией срезов с 10% козьей сывороткой и 0,05% тритоном X-100. В качестве первичных антител были использованы анти-МНС II класса (1:4; rat anti rat RT1Bu, Class II polymorphic; Serotec, Великобритания) и анти-SP (1:500; кроличьего антитела к веществу P; Chemicon International, США). Для визуализации МНС II класса и SP были использованы меченные флюорохромом вторичные антитела Alexa Fluor 488 (1:250; козы противокрысиные IgG; Invitrogen, США) и Alexa Fluor 568 (1:250; козы противокроличьи IgG; Invitrogen, США) соответственно. Микроскопию препаратов проводили с помощью флюоресцентного микроскопа Olympus (Olympus, Германия), снабженного цифровой камерой и набором светофильтров, выявляющих красную флюоресценцию Alexa Fluor 568 и зеленую флюоресценцию Alexa Fluor 488. Анализ изображений был сделан с помощью программы Adobe Photoshop CS2. Количественное распределение исследуемых клеток оценивали при подсчете их в 12 полях зрения микроскопа (об. 60, ок. 10). Оценку статистической значимости полученных данных проводили по t-критерия Стьюдента.

Результаты исследования. Обнаружено, что ГЭ у крыс ведет к гипертрофии долек тимуса за счет увеличения размеров как их мозгового, так и коркового вещества. В таких долях мозговое вещество на отдельных участках образует выпячивания в направлении коркового.

В срезах тимуса интактных животных МНС-II-позитивные клетки (АПК) в большем количестве выявляются в кортикостеллярной зоне, где они располагаются по всей ее протяженности плотно в 1–2 ряда. Многие клетки имеют неправильно-полигональную отростчатую форму, но среди них встречаются единичные клетки округлой

формы. Размер их колеблется между $7,5\pm 0,5$ мкм и $8,8\pm 0,6$ мкм. В центре большинства клеток хорошо видны темные контуры округлого ядра. В корковом и мозговом веществе долек тимуса АПК располагаются диффузно, преобладая в корковом веществе.

ГЭ ведет к резкому увеличению количества АПК на единице площади в корковом и особенно в мозговом веществе долек (таблица). При этом в мозговом веществе появляются малые по размеру МНС-II-позитивные клетки, располагающиеся диффузно или образующие небольшие скопления из 20–25 клеток. В то же время, в кортикостеллярной зоне, являющейся местом, откуда зрелые тимоциты покидают тимус и в дальнейшем заселяют Т-зоны периферических лимфоидных органов, их количество на фоне недостатка мужских половых гормонов значимо уменьшается в 1,18 раза (см. таблицу).

Популяция SP-позитивных клеток располагается в тимусной доле диффузно. Это относительно крупные (до 7 мкм) клетки, характеризующиеся вытянутой, веретенообразной, чаще угловато-неправильной формой, без отростков. Флюоресцентный сигнал распределен в цитоплазме неравномерно, образуя гранулярные скопления. SP-содержащие клетки в тимусной доле интактных крыс преобладают в кортикостеллярной зоне, меньшее их количество содержится в корковом веществе и минимальное — в мозговом (см. таблицу).

После ГЭ морфологические признаки SP-содержащих клеток не изменяются, но их количество уменьшается во всех исследованных зонах тимуса (см. таблицу).

Двойное флюоресцентное окрашивание МНС-II- и SP-содержащих клеток показывает, что эти популяции клеток контактируют друг с другом, располагаясь либо плотно друг к другу, либо на небольшом расстоянии, не превышающем размеры самих клеток. Наибольшее количество таких контактов на единице площади отмечается в кортикостеллярной зоне долек тимуса. Недостаток мужских половых гормонов в организме приводит к уменьшению количества контактов между АПК и SP-содержащими клетками во всех изученных зонах долек тимуса.

Обсуждение полученных данных. В литературе имеется описание распределения SP-позитивных структур в тимусе рептилий, птиц, грызунов, млекопитающих и человека. Выявлены функциональные рецепторы SP на поверхности лимфоцитов, макрофагов, тучных клеток [9]. В соединительной ткани капсулы и септ тимуса

Количество МНС-II- и SP-позитивных структур тимуса в норме и после гонадэктомии (ГЭ) ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$)

Структуры тимуса	МНС-II-содержащие структуры		SP-содержащие структуры	
	Интактная группа (контроль)	Подопытная группа (ГЭ)	Интактная группа (контроль)	Подопытная группа (ГЭ)
Корковое вещество	5,4±0,6	6,43±0,20*	8,4±0,4	4,8±0,5***
Кортикомедуллярная зона	13,9±1,2	11,6±0,6**	12,1±0,9	8,3±0,5**
Мозговое вещество	1,85±0,24	6,8±1,2***	3,7±0,4	1,92±0,26**

Различия показателей в подопытной группе по сравнению с контролем значимы:

* при $P \leq 0,05$.

** При $P \leq 0,01$.

*** При $P \leq 0,001$.

были идентифицированы SP-содержащие нервные волокна, которые находились в тесном контакте с тучными клетками [11] и сосудами [9]. D. Lorton и соавт. [11] описали SP-позитивные нервные волокна у крыс в окружающей тимус жировой и соединительной ткани, в капсуле тимуса, в междольковых септах, от которых они отходят вглубь коркового вещества, и кортикомедуллярной зоны между тимоцитами и тучными клетками, что, по их мнению, свидетельствует об участии SP в процессе развития и функционирования тимоцитов, тучных клеток и других иммунокомпетентных клеток тимуса. Установлено, что эти нервные волокна немиелинизированы и имеют участки с мелкими флюоресцентными (светящимися) гранулами.

Экспрессия SP выявлена не только в нервных окончаниях, но и в популяциях некоторых клеток. В пищеварительном тракте активными продуцентами вещества P являются апудоциты — EC₁-клетки, наибольшее количество которых отмечается в двенадцатиперстной и ободочной кишке. Согласно данным S.R. Jugjuz и соавт. [9], в тимусе SP-позитивные клетки, так же как и SP-позитивные нервные волокна, встречаются по всему органу, одиночно или группами, независимо от хода кровеносных сосудов, преобладавая в кортикомедуллярной зоне дольки тимуса. G. Santoni и соавт. [15] идентифицировали SP секретирующие структуры как ТЭК и CD5⁺-тимоциты.

Выявленные в наших экспериментах SP-позитивные клетки имеют морфологические признаки ТЭК, количество которых наибольшее в кортикомедуллярной зоне. Известно, что популяция ТЭК неоднородна: различают «темные» и «светлые» ТЭК [1]. «Темные» секреторные ТЭК (преимущественно субкапсулярные и медуллярные) имеют нейроэктодермальное происхождение, являясь производными нервного гребня, и секретируют нейропептиды [12]. Мы предполагаем, что описанные нами SP-позитивные клетки являются диффузно разбросанными «темными» нейроэндокринными клетками, относящимися к представителям APUD-системы в тимусе. Кроме того, И.В. Спириным и В.Е. Сергеевой [3] в тиму-

се были описаны белок S-100-позитивные клетки (ДК), характеризующиеся признаками нейроэндокринных клеток: наличие в их гранулах биогенных аминов, положительная реакция на моноаминоксидазу и окрашивание альдегид-фуксином (свидетельство продукции ими пептидных гормонов) [2]. Мнение о том, что клетки APUD-системы не могут быть мезенхимальной природы, а развиваются из нервного гребня, не подтвердилось [5].

ГЭ ведет к глубоким морфологическим изменениям в тимусе, что выражается в гипертрофии долек, увеличении количества АПК (МНС-II-позитивных клеток) в корковом и мозговом веществе и снижении популяции SP-позитивных клеток во всех зонах тимуса. Учитывая присутствие рецепторов SP на макрофагах, а также наличие контактов между описанными популяциями клеток, являющихся, вероятно, представителями APUD-системы, можно предположить наличие тесного сотрудничества этих клеток в тимусе в процессах пролиферации и дифференцировки развивающихся тимоцитов. Кроме того, учитывая наличие рецепторов тестостерона на ТЭК и тимоцитах [14], следует отметить, что подобные взаимодействия между эндокринной, нейропептидной и иммунокомпетентной системами зависят от функционального состояния всего организма, изменяясь под влиянием недостатка мужских половых гормонов. ГЭ приводит к снижению количества контактов между этими популяциями клеток, что определенно отражается на интенсивности иммунных процессов.

Описанный нами пример эндокринной регуляции нейроиммунных взаимодействий в тимусе при недостаточности мужских половых гормонов в очередной раз демонстрирует наличие нейроиммуноэндокринных взаимодействий в целостном организме, благодаря которым обеспечивается постоянство внутренней среды.

Итак, ГЭ ведет к гипертрофии долек тимуса за счет увеличения площади как мозгового, так и коркового вещества. МНС-II- и SP-позитивные клетки тимуса образуют популяции, кон-

тактирующие между собой и демонстрирующие наличие тесного сотрудничества между иммунной и нервной системами. Недостаточность мужских половых гормонов в организме оказывает модулирующее влияние на нейроиммунные взаимодействия в центральном органе иммунитета, что проявляется увеличением количества антигенпредставляющих клеток в мозговом и корковом веществе и уменьшением количества SP-позитивных клеток во всех зонах долек тимуса.

ЛИТЕРАТУРА

1. Кветной И.М., Ярилин А.А., Полякова В.О. и Князькин И.В. Основные нейроиммуноэндокринные сигнальные молекулы тимуса. В кн.: Нейроиммуноэндокринология тимуса. СПб., Изд-во ДЕАН, 2005, с. 34–76.
2. Сергеева В.Е. и Смирнова Т.Л. Нейроэндокринные клетки тимуса при овариоэктомии и эстрогенном воздействии. В кн.: Морфология в теории и практике: Материалы Всерос. конф. Чебоксары, Изд-во Чувашск. ун-та, 2008, с. 112–114.
3. Спиринов И.В. и Сергеева В.Е. Локализация белка S-100 в структурах тимуса методом непрямой иммуногистохимии. В кн.: Актуальные проблемы диагностики и лечения в клинике внутренних болезней: Материалы конф., посвящ. юбилею Республиканского диагностического центра. Чебоксары, Изд-во Чувашск. гос. ун-та, 2000, с. 104–105.
4. Хаитов Р.М. и Алексеев Л.П. Физиологическая роль главного комплекса гистосовместимости человека. Иммунология, 2001, № 3, с. 4–11.
5. Яглов В.В. Биология диффузной эндокринной системы: Курс лекций. М., Изд-во вет. акад. им. К.И. Скрябина, 1993.
6. Ярилин А.А., Пинчук В.Г. и Гриневич Ю.А. Структуры тимуса и дифференцировка Т-лимфоцитов. Киев, Наук. думка, 1991.
7. Dimri R., Sharabi Y. and Shoham J. Specific inhibition of glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis by substance P. J. Immunol., 2000, v. 164, p. 2479–2486.
8. Grossman C. J., Sholiton L. J. and Roselle G. A. Dihydrotestosterone regulation of thymocyte function in the rat mediated by serum factors. J. Steroid Biochem., 1983, v. 19, № 4, p. 1459–1467.
9. Jurjus S.R., More N. and Walsh R.J. Distribution of substance P positive cells and nerve fibers in the rat thymus. J. Neuroimmunol., 1998, № 90, p. 143–148.
10. Kumar N., Shan L.X., Hardy M.P. et al. Mechanism of androgen-induced thymolysis in rats. J. Endocrinol., 1995, v. 136, p. 4887–4893.
11. Lorton D., Bellinger D.L., Felten S.Y. and Felten D.L. Substance P Innervation of the rat thymus. J. Peptides, 1990, v. 11, p. 1269–1275.
12. Meintlein R. and Kendall M.D. The brain and thymus have much in common: a functional analysis of their microenvironments. J. Immunol. Today, 2000, v. 21, p. 133–140.
13. Mignini F., Streccioni V. and Amenta F. Autonomic innervation of immune organs and neuroimmune modulation. Autonomic Autacoid. J. Pharmacology, 2003, v. 23, p. 1–25.
14. Olsen N.J., Olson G., Viselli S.M. et al. Androgen Receptors in Thymic Epithelium Modulate Thymus Size and Thymocyte Development. J. Endocrinol., 2001, v. 142, № 3, p. 1278–1283.
15. Santoni G., Amantini C., Lucciarini R. et al. Expression of substance P and its neurokinin-1 receptor on thymocytes: functional relevance in the regulation of thymocyte apoptosis and proliferation. J. Neuroimmunomodulation, 2003, v. 10, p. 232–246.
16. Seiki K. and Sakabe K. Sex hormones and the thymus in relation to thymocyte proliferation and maturation. Arch. Histol. Cytol., 1997, v. 60, p. 29–38.
17. Silva A.B., Aw D. and Palmer D.B. Functional analysis of neuropeptides in avian thymocyte development. J. Immunol., 2008, № 32, p. 410–420.

Поступила в редакцию 19.03.08
Получена после доработки 25.08.08

DISTRIBUTION OF SP-CONTAINING STRUCTURES AND ANTIGEN PRESENTING CELLS IN THE THYMUS OF MALE RATS AFTER GONADECTOMY

I.L. Sarilova, V.Ye. Sergeeva and T.L. Smirnova

The distribution of SP-positive structures in the thymus and their connection with the antigen presenting cells (MHC-II-expressing) were studied under normal conditions and in male sex hormones deficiency (gonadectomy). Indirect immunohistochemical immunofluorescence method with the antibodies against Major Histocompatibility Complex class II proteins (MHC-II, antigen presenting cell marker) and against substance P (SP) was used. The population of antigen presenting cells (expressing MHC-II) and SP-positive structures of the thymus were found to form contacts. Gonadectomy resulted in the increased numbers of antigen presenting cells both in thymic medulla and cortex of thymus and in the decrease of SP-positive cell number in all the zones of thymic lobules. The results of this study demonstrate the existence of close cooperation between endocrine, neuropeptide and immunocompetent systems.

Key words: *thymus, antigen presenting cells, substance P (SP), gonadectomy.*

Department of Medical Biology, Chuvash State University, Cheboksary