

# ОРИГИНАЛЬНАЯ СТАТЬЯ

## ЛЮМИНЕСЦЕНТНО-ГИСТОХИМИЧЕСКАЯ МОРФОЛОГИЯ ТИМУСА ПРИ АКТИВАЦИИ И СУПРЕССИИ ГУМОРАЛЬНОГО ИММУНИТЕТА

## LUMINESCENT-HISTOCHEMICAL MORPHOLOGY OF THYMUS ACTIVATION AND SUPPRESSION OF HUMORAL IMMUNITY

Л.Ю. Ильина

L.Yu. Ilyina

Кафедра гистологии, Медицинский институт, Чувашский государственный университет, Московский проспект, 45, Чебоксары 428015 Россия.

Department of Histology, Medical Institute, Chuvash State University, Moskovsky Avenue, 45, Cheboksary 428015 Russia.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** тимус, гуморальный иммунитет, иммуносупрессия, иммуноактивация, биоамины, тучные клетки.

**KEY WORDS:** thymus, humoral immunity, immunosuppression, immunoactivation, mast cells, bioamines.

**РЕЗЮМЕ:** В эксперименте на белых беспородных крысах исследовались люминесцентная морфология и гистохимия тимуса, а также перераспределение биогенных аминов по структурам тимуса при изменениях гуморального иммунитета. Показано, что люминесцентная картина дольки тимуса и концентрация биогенных аминов различны в условиях супрессии и активации В-иммунного ответа. Отмечено, что различаются и серотониновые индексы люминесцирующих гранулярных клеток у интактных и подопытных животных. Кроме того, установлено, что при супрессии гуморального иммунитета циклофосфаном имеет место неполная гепариновая и белковая инактивации биогенных аминов в тучных клетках. Введение неспецифической лошадиной сыворотки, в качестве активатора В-иммунного ответа, характеризуется полной белковой инактивацией биогенных аминов. Полученные результаты имеют непосредственное отношение к проблемам иммунофармакологии микроэлементов.

**ABSTRACT:** Luminescent morphology and histochemistry of thymus and redistribution of biogenic amines according the thymic structure with humoral immunity changes were studied in the experiment with white mongrel rats. Luminescent picture of thymic lobule and concentration of biogenic amines proved to be different in condition of suppression and activation of B-immune response. There was found out that serotonin indexed of luminescent granular cells in intact and experimental animals are not similar. Besides incomplete heparin and albuminous inactivation of biogenic amines in mast cells is estimated to occur with suppression of humoral immunity by cyclophosphan. Injection of non-specific horse

serum as an activator of immune response is characterized by complete albuminous inactivation of biogenic amines. All above mentioned is directly connected with immunofarmacology of trace elements.

### Введение

В настоящее время большое внимание уделяется изучению структурно-функциональных элементов тимуса, которые содержат в себе те или иные нейромедиаторы и биологически активные вещества, обеспечивающие его участие в иммунологических реакциях. Это связано с тем, что увеличивается число заболеваний, связанных с нарушениями в иммунной системе, а также недостаточной осведомленности практической медицины о механизмах возникновения и развития этих заболеваний, и, следовательно, о способах их профилактики и лечения.

В современной научной литературе достаточно широко освещены многие аспекты строения тимуса, его участия в реализации реакций клеточного иммунитета. Было установлено, что в регуляции иммунной системы, при контакте организма с антигеном важную роль играют нейромедиаторы (Гордон и др., 1982; Корнева, Шхинек, 1988). Имеются данные о том, что серотонинергическая система участвует в иммуносупрессии, а допамин стимулирует продукцию лимфоцитов-хелперов (Девойно, Ильюченко, 1983). Установлено, что в создании биоаминного обеспечения тимуса участвуют адренергические нервные волокна, люминесцирующие гранулярные клетки (ЛГК) долек и тучные клетки (Гордон и др., 1982; Любовцева, 1993; Сергеева, Гордон, 1992). По данным Г.Ю. Стручко (1999), введение человеческого γ-

глобулина приводит к изменению уровня биогенных аминов в премедулярных, субкапсулярных, глубоких корковых ЛГК и тучных клетках. С.А. Ястребовой и соавт. (2000) было описано изменение уровня биогенных аминов и состояния тучноклеточной популяции тимуса на введение гидрокортизона, который является супрессором Т-зависимого звена иммунитета. Кроме того, О.И. Олангиным (2000) было установлено, что каждому триместру нормально протекающей беременности у крыс соответствует определенная люминесцентная морфология тимуса, которая совпадает с определенным иммунным статусом организма: I триместр беременности — иммунный конфликт, II — супрессия, III — активация иммунитета (Винокур, 1991; Креймерман, 1988; Макаричева, 1979).

К сожалению, в современной литературе содержится мало данных об особенностях распределения биогенных аминов, состояния тучноклеточной популяции и способах инактивации биогенных аминов в тучных клетках в условиях супрессии или активации гуморального (В-зависимого) иммунитета.

В связи с вышеизложенным, становится актуальным изучение структур тимуса после воздействия на организм препаратов, активирующих или подавляющих В-иммунитет.

**Цель работы:** исследование и сравнение люминесцентной морфологии и гистохимии, а также изучение перераспределения биогенных аминов по структурам тимуса при изменении гуморального иммунитета.

## Материалы, методы и объем исследований

Объектом настоящего исследования служила вилочковая железа 90 самок белых беспородных крыс (20 контрольных и 70 подопытных).

Исследование проводилось весной и осенью.

Подопытные животные были разделены на 2 группы, которым вводились следующие вещества, имеющие воздействие на В-иммунитет:

I — В-иммуносупрессор — циклофосфан в дозе 4 мг/кг, в/в — 35 особей;

II — активатор В-зависимого иммунитета — неспецифическая лошадиная сыворотка в дозе 0,5 мл, в/м — 35 особей.

**Схема эксперимента:** опытные животные получали инъекции ежедневно в течение трех дней. Забой проводился на третий день, через 2 часа после последнего введения препарата. Тимус извлекался под глубоким эфирным наркозом. Далее делались криостатные срезы толщиной от 20 до 40 мкм.

В работе использованы следующие методы:

1. Метод окраски полихромным толуидиновым синим по Унна — для качественной характеристики степени зрелости или степени сульфатации мукополисахаридов и гликозаминогликанов тучных клеток;
2. Окраска суданом черным В с продленным гидро-

лизом для выявления комплексно-связанных внутриклеточных липидов;

3. Окраска альциановым синим и сафранином по Спайсеру (Spicer, 1960) для выявления зрелого гепарина и других кислых гликозаминогликанов с одновременным выявлением протеинов;

4. Окраска азуром-2-эозином по Романовскому-Гимза для выявления белковых компонентов тучно-клеточной зернистости. Этот метод был применен на основании того, что по энциклопедии Krstich азур-2 окрашивает белковый компонент клеток;

5. Люминесцентно-гистохимический метод Фалька-Хилларпа (Falck et al., 1962) в модификации Е.М. Крохиной (Крохина, Александров, 1969) для избирательного выявления аминокислотосодержащих структур тимуса и адренергических нервных волокон.

Полученные цифровые данные обрабатывались статистически по специально поставленной программе на компьютере с использованием пакета программ Microsoft Office (Word и Excel). Статистическую достоверность определяли критерием Стьюдента ( $t$ ). Для удобства при подсчете цифровые значения умножали на 1000.

Кроме того, для определения биоаминного обеспечения органа и его функционального состояния определялось соотношение содержания отдельных биоаминов (Вайсфельд, Кассиль, 1981). Соотношение серотонина и катехоламинов принято называть **серотониновым индексом**, или коэффициентом реципрокности. Серотониновый индекс рассчитывается по формуле:

$$I_s = \frac{\sum \frac{St}{KA}}{n}$$

где  $I_s$  — серотониновый индекс;  $St$  — концентрация серотонина в одной клетке;  $KA$  — концентрация катехоламинов в одной клетке;  $n$  — число клеток.

Когда серотониновый индекс больше единицы, можно говорить о преобладании в клетке серотонина. Если меньше единицы, то в клетке преобладают катехоламины. Эти данные могут быть полезны при оценке состояния иммунной системы, так как по данным Л.В. Девойно (1983) серотонин обладает способностью увеличивать количество лимфоцитов-супрессоров и подавлять иммунный ответ.



Рис. 1. ДОЛЬКА ТИМУСА КРЫСЫ ПОСЛЕ ВВЕДЕНИЯ ЦИКЛОФОСФАНА. Метод Фалька. Об.10, ок. гомаль 1,7.

Fig. 1. THE THYMIC LOBULE OF RAT AFTER CYCLOPHOSPHANE INJECTION, Falk method. Ob. 10, occ. gomal 1.7.



Рис. 2. ДОЛЬКА ТИМУСА КРЫСЫ ПОСЛЕ ВВЕДЕНИЯ НЕСПЕЦИФИЧЕСКОЙ ЛОШАДИНОЙ СЫВОРОТКИ. Метод Фалька. Об.10, ок. гомаль 1,7.

Fig. 2. THE THYMIC LOBULE OF RAT AFTER NON-SPECIFIC HORSE SERUM INJECTION, Falk method. Ob. 10, occ. gomal 1.7.

## Результаты и их обсуждение

При исследовании срезов, обработанных по методу Фалька-Хилларпа, были обнаружены различия в люминесцентной морфологии тимуса у интактных и подопытных животных. У интактных животных дольки тимуса четко очерчены, в них можно различить мозговое и корковое вещество. Премедуллярные люминесцирующие гранулярные клетки (ЛГК) располагаются в один или два ряда на границе мозгового и коркового веществ. Это крупные яркие клетки с желтовато-белыми гранулами. Субкапсулярные клетки, имеющие желтовато-зеленое свечение, беспорядочно располагаются на периферии коркового вещества. В толще коркового вещества диффузно разбросаны неяркие клетки с желтоватыми гранулами — глубокие ЛГК. Тучные клетки овальной формы с желтоватыми гранулами располагаются в септах, в паренхиме практически не встречаются. В срезах тимуса подопытных животных, получавших циклофосфан (I группа) премедуллярные ЛГК не образуют

непрерывного ряда, в то же время обнаруживается большое количество субкапсулярных и глубоких ЛГК. Мастоциты располагаются в септах, чаще группами по 3–5 клеток (рис. 1).

Во II группе (введение неспецифической лошадиной сыворотки) премедуллярные ЛГК образуют непрерывный слой, состоящий из нескольких рядов ярких клеток с крупными гранулами, субкапсулярные ЛГК образуют четкий ряд на периферии дольки, встречаются единичные глубокие ЛГК. Тучные клетки практически не обнаруживаются (рис. 2).

Интенсивность свечения биогенных аминов в люминесцирующих структурах тимуса интактных и опытных животных и серотониновый индекс представлены в табл. 1.

Нами было отмечено, что у интактных животных мозговое вещество долек тимуса чаще имеет полигональную форму (40,8%), реже округлую (32,7%) и “амебовидную” (26,5%). У экспериментальных животных это соотношение следующее: в I группе — округлое мозговое вещество встречается в 30,5%

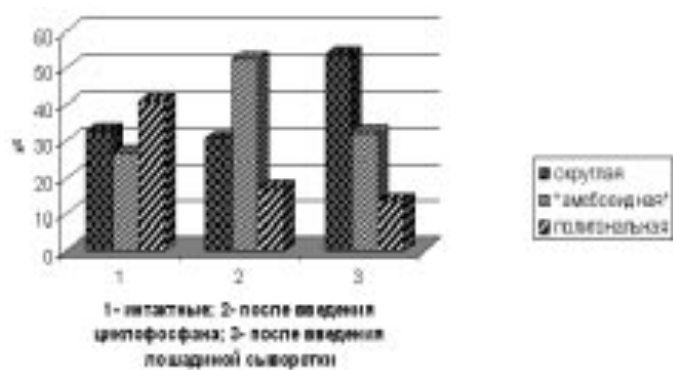
ТАБЛИЦА 1. ПОКАЗАТЕЛИ СОДЕРЖАНИЯ СЕРОТОНИНА И КАТЕХОЛАМИНОВ В ЛЮМИНЕСЦИРУЮЩИХ СТРУКТУРАХ ТИМУСА У ИНТАКТНЫХ И ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ЖИВОТНЫХ.

Исследуемые группы	Премедуллярные ЛГК			Субкапсулярные ЛГК			Глубокие ЛГК		
	КА	СТ	SI	КА	СТ	SI	КА	СТ	SI
Интактные	0,128±0,04	0,206±0,06	1,61	0,154±0,02	0,183±0,01	1,19	0,080±0,02	0,131±0,05	1,63
I (В-супрессия)	0,256±0,06	0,459±0,05	1,8	0,146±0,04	0,261±0,08	1,79	0,179±0,04	0,325±0,01	1,82
II (В-активация)	0,312±0,03	0,349±0,06	1,12	0,132±0,04	0,207±0,06	1,59	0,071±0,02	0,093±0,05	1,31

КА — содержание катехоламинов в у.е.;

СТ — содержание серотонина в у.е.;

SI — серотониновый индекс.



### ЩЕСТВА ДОЛЕК ТИМУСА У ИНТАКТНЫХ И ПОДОПЫТНЫХ ЖИВОТНЫХ.

(32,7%) и "амебовидную" (26,5%). У экспериментальных животных это соотношение следующее: в I группе — округлое мозговое вещество встречается в 30,5% долек, "амебовидное" — в 52,4%, полигональное — в 17,1%, во II группе — 53,9%, 32,4% и 13,7% долек, соответственно (рис. 3).

При изучении популяции тучных клеток и способа инактивации биогенных аминов также обнаружены различия в тимусе интактных и подопытных животных.

Для определения степени метахромазии мукополисахаридного комплекса в тканях тимуса и для контроля состояния гепарина в тучных клетках использовался метод окраски полихромным толуидиновым синим по Унна. Для определения способа инактивации биогенных аминов в тучных клетках были использованы несколько методов окраски: Суданом черным В с продленным гидролизом для выявления комплексно-связанных внутриклеточных липидов; альциановым синим и сафранином по Спайсеру для выявления зрелого гепарина и других кислых гликозаминогликанов с одновременным выявлением протеинов; азуром-2-эозином по Романовскому-Гимза для выявления белковых компонентов тучно-клеточной зернистости.

В срезах тимуса интактных животных при окраске по Унна тучные клетки обнаруживаются в дольках и в паренхиме железы (1,5 клетки в поле зрения). Большинство из этих клеток обладают  $\beta_2$ -метахромазией, которая свидетельствует о содержании сульфатированного созревающего гепарина. Встречается небольшое количество клеток с  $\beta_1$ -метахромазией с сульфатированным созревающим гепарином. Эти клетки можно отнести к  $T_0$ -форме, так как гранулы в них плотно расположены в цитоплазме, а ядро закрыто зернистостью. При окраске по Спайсеру тучные клетки имеют альцианофильную цитоплазму с альцианофильным ядром, а также альцианофильную цитоплазму с сафранинофильным ядром.

У животных I группы (введение циклофосфана) при окраске срезов тимуса по Унна обнаруживается 3,7 тучных клетки в поле зрения. В данном случае большинство тучных клеток обладает  $\beta_1$ - и  $\beta_2$ -метахромазией, редко встречаются ортохромные клетки. По степени дегрануляции, согласно классификации Д.П.

Линднер и соавт. (1980) и Г.Ю. Стручко (1999), большую часть из них можно отнести к  $T_2$ -форме, так как они имеют округлую форму, светлое ядро и четкие гранулы внутри и снаружи клетки при неповрежденной цитоплазматической мембране. Иногда встречаются полностью дегранулированные клетки, с зернистостью, выходящей за пределы нарушенной цитоплазматической мембраны ( $T_3$ -формы). При окраске на комплексно-связанные липиды определяется до 5 тучных клеток в поле зрения со светло-серыми гранулами, что свидетельствует о неполной инактивации биоаминов. После окраски по Спайсеру выявляется 2,25–2,5 тучных клетки в поле зрения. В равной степени обнаруживаются клетки с альцианофильной и сафранинофильной цитоплазмой. Окраске по Романовскому-Гимза выявляет относительно большее количество тучных клеток (4 в поле зрения). Форма тучных клеток округлая. Ядро закрыто зернистостью. Зернистость клеток окрашивается азуром-2.

В срезах тимуса животных II группы (введение неспецифической лошадиной сыворотки) при окраске по Унна намного меньше тучных клеток (1–1,2 в поле зрения). Это клетки с ортохромной, реже с  $\beta_1$ -метахроматической зернистостью. В данном случае встречается два вида клеток: а) круглые клетки с плотно расположенными гранулами, ядро которых закрыто зернистостью и визуально не определяется ( $T_0$ -форма); б) клетки продолговатой формы с четкими гранулами и определяющимся частично ядром ( $T_1$ -форма). После окраски по Спайсеру в поле зрения выявляется 2,8 тучных клетки, большинство из которых имеют сафранинофильную цитоплазму, по Романовскому-Гимза — 2,5 клеток с азур-2-положительной зернистостью. Встречается небольшое количество клеток (0,4 в поле зрения) с положительной окраской суданом черным "В" на липиды. Фосфолипиды в этих клетках выявляются в виде мелких рыхлых черных гранул.

Полученные нами данные показали, что люминесцентная морфология и гистохимия тимуса различны у интактных и опытных животных. В условиях активации и супрессии гуморального иммунитета происходит изменение формы мозгового вещества долек тимуса, а также интенсивности свечения катехоламинов и серотонина в люминесцирующих гранулярных клетках и показателей серотониновых индексов этих клеток. При супрессии В-иммунитета циклофосфаном происходит увеличение интенсивности свечения катехоламинов и серотонина, главным образом, в премедулярных и глубоких ЛГК. При В-активации неспецифической лошадиной сывороткой происходит увеличение интенсивности свечения биоаминов в премедулярных клетках, причем в большей степени увеличивается интенсивность свечения катехоламинов. Серотониновые индексы клеток различны во всех рассматриваемых ситуациях, но во всех случаях больше единицы.

Анализируя полученные результаты, следует отметить определенные различия в состоянии тучно-клеточной популяции и способе инактивации био

клетках центр гранулы занимает липопротеид, с ним связываются биогенные амины и затем покрываются гепарином. Согласно предложенной им классификации, тучные клетки тимуса подразделяются на следующие формы: 1) развивающиеся; 2) реализующие программу; 3) завершающие программу и 4) абортивно гибнущие (Гордон и др., 1982; Бочкарев и др., 1982) У интактных и экспериментальных животных количество перечисленных форм тучных клеток различно. У интактных животных преобладают клетки, завершающие, реже реализующие свою программу. В срезах тимуса животных, получавших циклофосфан (В-супрессия) преобладают клетки с завершенным циклом. При В-активации (введение неспецифической лошадиной сыворотки) чаще обнаруживаются развивающиеся молодые клетки, а также клетки, реализующие свою программу.

Анализ данных люминесцентных и гистохимических методов исследования показывает, что при В-супрессии (введение циклофосфана) количество тучных клеток увеличивается. Биогенные амины в тучных клетках выявляются в люминесцентной реакции. Окраска Суданом черным "В" свидетельствует о частичной инактивации биоаминов фосфолипидами. Окрашивание гранул тучных клеток методом Романовского-Гимза свидетельствует о покрытии биогенных аминов в гранулах тучных клеток белковым компонентом, а выявление тучных клеток по Унна и альцианофильность их цитоплазмы по Спайсеру — об участии в инактивации биоаминов гепарина. Таким образом, можно предположить, что при супрессии гуморального звена иммунитета имеет место неполная белковая и гепариновая инактивация биогенных аминов в тучных клетках.

При активации В-иммунитета неспецифической лошадиной сывороткой биогенные амины в тучных клетках полностью нейтрализованы, так как не определяются в люминесцентной реакции на биоамины и в реакции на комплексно-связанные липиды, но не гепарином, так как при обработке срезов по Унна выявляются ортохромные виды тучных клеток, а по Спайсеру — сафранинофильные. Нейтрализация биогенных аминов, вероятно, идет за счет других веществ — доноров кислых радикалов. Работы Л.А. Любовцевой (1993) и В.А. Бочкарева и соавт. (1982) свидетельствуют о нейтрализации биогенных аминов, достигнутой брадикинином, а не гепарином. Учитывая то, что зернистость тучных клеток окрашивается по Романовскому-Гимза и сафранинофильна по Спайсеру, можно предположить, что в данном случае имеет место полная белковая инактивация биогенных аминов в тучных клетках.

## Выводы

1. Активация В-иммунитета введением неспецифической лошадиной сыворотки, а также супрессия циклофосфаном приводит к изменению люминесцентно-гистохимической морфологии тимуса.

2. Люминесцентная картина дольки тимуса и концентрация биогенных аминов в тимусе крыс различны в условиях супрессии и активации В-иммунного ответа; серотониновые индексы люминесцирующих гранулярных клеток также различаются, но во всех ситуациях больше единицы.

3. При супрессии и активации гуморального звена иммунитета изменяются характеристика тучно-клеточной популяции и способ неферментной инактивации биогенных аминов.

4. При введении циклофосфана в качестве иммуносупрессора имеет место неполная белковая и гепариновая инактивация биогенных аминов в тучных клетках.

5. Активация иммунного ответа неспецифической лошадиной сывороткой характеризуется полной белковой инактивацией биогенных аминов в тучных клетках.

## Литература

- Бочкарев В.А., Гордон Д.С., Андреев С.Н. 1982. Морфология и гистохимия тканей в норме, патологии и эксперименте. Чебоксары. С.98–102.
- Вайсфельд И.Л., Кассиль Г.Н. 1981. Гистамин в биохимии и физиологии. М.: Наука. 277 с.
- Винокур С.И. 1991. Люминесцентно-гистохимическое исследование моноаминов селезенки на ранних сроках иммунитета и при беременности. Автореф. дис. ... канд. мед. наук. Новосибирск. 20 с.
- Гордон Д.С., Сергеева В.Е., Зеленова И.Г. 1982. Нейромедиаторы лимфоидных органов. Л.: Наука. 128 с.
- Девойно Л.В., Ильюченко Р.Ю. 1983. Моноаминергические системы в реализации иммунной реакции (серотонин, дофамин). Новосибирск: Наука, Сибирское отделение. С.234.
- Корнева Е.А., Шхинек Э.К. 1988. Гормоны и иммунная система. Л.: Наука. С.251
- Крохина Е.М., Александров П.Н. 1969. Кардиология.
- Креймерман Г.М. 1988. Люминесцентно-гистохимический анализ моноаминного обеспечения матки при беременности и иммунологическом конфликте. Автореф. дис. ... канд. мед. наук. Ташкент. 17 с.
- Линдлер Д.П., Поберий И.А., Розкин М.Я., Ефимов В.С. 1980. Морфометрический анализ популяции тучных клеток // Архив патологии. № 6. С.60–64.
- Любовцева Л.А. 1993. Люминесцентно-гистохимическое исследование аминокислотосодержащих структур костного мозга, тимуса и крови при действии нейромедиаторов и антигенов. Чебоксары: Чуваш. ун-т. С.100.
- Макаричева А.Д. 1979. Иммунологические процессы и беременность. Новосибирск: Наука. Сиб. отд. 207 с.
- Олангин О.И. 2000. Гистохимия макрофагов тимуса при усиленном и подавленном иммунном ответе на модели 1, 2, и 3 триместров беременности. Автореф. дис. ... канд. мед. наук. Чебоксары. 20 с.
- Сергеева В.Е., Гордон Д.С. 1992. Люминесцентно-гистохимическая характеристика ранней реакции моноаминсодержащих структур тимуса на антигенные воздей-

ствия. Чебоксары: Чуваш. ун-т. С.35.

Стручко Г.Ю., Сергеева В.Е. 1999. Реакция биоаминсодержащих структур тимуса на введение растворимого антигена. Чебоксары. 130 с.

Ястребова С.А., Сергеева В.Е. 2000. Механизмы гидрокортизоновой иммуномодуляции биоаминной клеточной системы тимуса. Чебоксары: Мир Детектива. 83 с.

Falck B., Hillarp N.A., Thieme G., Torp A. 1962. Fluorescence of catecholamines and related compounds condensed with formaldehyde // J. Histochem. Cytochem. Vol.10. P.348–354.

Spiser S.S. 1960. A correlative study of the histochemical properties of rodent acid mucopolysaccharides // J. Histochem. Cytochem. Vol.8. P.18–36.