

УДК: 591. 81: 591. 144. 4: 615. 357. 015. 44

## ВЛИЯНИЕ ГЛЮКОКОРТИКОИДОВ НА МОРФОТИПЫ NSE-ПОЗИТИВНЫХ КЛЕТОК СЕЛЕЗЁНКИ

Лузикова Е.М., Сергеева В.Е., Кириллова О.Н., Скворцова М.М., Иванова К.О.  
ФГОУ ВПО «Чувашский государственный университет им. И.Н. Ульянова», Чебоксары,  
e-mail: tikhon-sergeev@yandex.ru

Исследовали влияние преднизолона и дексаметазона на количественные и морфологические характеристики NSE-позитивных клеток разных функциональных зон селезёнки. В ходе морфометрического исследования были выделены пять морфотипов NSE-позитивных клеток. Клетки разных морфотипов отличаются локализацией и количественной реакцией на глюкокортикоиды. Выявлено, что преднизолон стимулирует миграцию NSE-позитивных клеток из кровяного русла и пролиферацию исследуемых клеток в красной пульпе селезенки, дексаметазон активизирует только пролиферацию исследуемых клеток в красной пульпе селезенки.

**Ключевые слова:** селезенка, преднизолон, дексаметазон, нейрон-специфическая эналаза, NSE-позитивные клетки

## THE GLUCOCORTICOIDS EFFECT ON THE NSE-POSITIVE CELLS MORHPOTYPES OF THE SPLEEN

Luzikova E.M., Sergeeva V.E., Kirillova O.N., Skvorcova M.M., Ivanova K.O.  
FGOU VPO «Chuvash State University I.N. Ulyanov», Cheboksary, e-mail: tikhon-sergeev@yandex.ru

The aim of our research was to study the effects of prednisolone and dexametasone on the quantitative and morphological characteristics of NSE- positive cells in different functional zones of the spleen. During the morphometrical research we set up five morphotypes of NSE+-cells. The cells of the different morhpotypes characterized localization and quantification of response to glucocorticoids. Revealed that prednisolone stimulates migration of NSE-positive cells from the bloodstream and proliferation of cells studied in the red pulp of the spleen, dexamethasone activates only the proliferative-talkie studied cells in the red pulp of the spleen.

**Keywords:** spleen, prednisolone, neuron specific enolase, NSE-positive cells

Нейронспецифическая эналаза (NSE) представляет собой  $\gamma\gamma$ -субъединицу гликолитического фермента эналазы, участвующего в превращении 2-фосфоглицерата в фосфоенолпируват. Фермент присутствует в клетках нейроэктодермального происхождения, нейронах головного мозга и периферической нервной ткани. NSE – специфический сывороточный маркер нейроэндокринных опухолей и клеток системы APUD [1, 4]. Клетки, положительные на нейронспецифическую эналазу (NSE<sup>+</sup>), выявляются в селезенке, пораженной опухолью нейроэктодермального или нейроэндокринного происхождения [4], но описания локализации и морфологии NSE-позитивных клеток интактной селезенки мы не нашли. Глюкокортикоиды часто используются для модуляции иммуносупрессии, но эффекты фторированных и нефторированных глюкокортикоидов отличаются. Реакция NSE-позитивных клеток селезенки на введение глюкокортикоидов и отличия в эффектах фторированных и нефторированных глюкокортикоидов изучены недостаточно.

**Целью нашего исследования** является изучение NSE<sup>+</sup> клеток селезенки в норме и под влиянием глюкокортикоидов. Задачи исследования:

1) определить среднее количество NSE<sup>+</sup> клеток в поле зрения в норме и под влиянием дексаметазона и преднизолона;

2) классифицировать морфотипы NSE<sup>+</sup> клеток селезенки в норме;

3) изучить локализацию и количество NSE<sup>+</sup> клеток разных морфотипов в паренхиме селезенки в норме и под влиянием дексаметазона и преднизолона;

4) выявить возможные отличия в эффектах дексаметазона и преднизолона.

### Материалы и методы исследования

Объектом исследования служила селезёнка 60 двухмесячных мышей-самцов, массой 22–24 г, которые были разделены на группы:

1 – интактные животные ( $n = 15$ );

2 – контрольные животные, которым вводился изотонический раствор ( $n = 15$ );

3 – животные, которым вводился однократно преднизолон из расчета 13 мг/кг, что составляет 0,3 мг ( $n = 15$ );

4 – животные, которым вводился однократно дексаметазон в дозе 0,3 мг ( $n = 15$ ).

Селезёнки забирались в один день под глубоким наркозом через 1 час после инъекции во второй половине дня (14–15.00). Все экспериментальные действия проводились согласно правилам проведения работ с использованием экспериментальных животных (UFAW). После фиксации в 10%-м растворе нейтрального формалина материал заливали парафином. Парафиновые срезы толщиной 5 мкм готовились на микротоме МПС-2, и после депарафинирования и регидратации в этаноле нисходящей концентрации срезы селезенки погружали в восстанавливающий цитратный буфер (pH 6,0). Затем проводили высокотемпературную обработку прогреванием на водя-

ной бане при 90–95 °С в течение 30 минут с целью демаскировки искомым антигенам в тканях. После ингибирования эндогенной пероксидазы 3%-м раствором перекиси водорода на метаноле проводили иммуногистохимическую реакцию методом трех-этапного непрямого иммуноферментного анализа с использованием первичных моноклональных антител (МКАТ) к антигенному маркеру NSE (Mo a Hu Neuron-Specific Enolase, Clone BBS/NC/VI-H14), а также МКАТ к антигенному маркеру макроссиалину (Mo a Hu CD68, Clone KP1) в разведении 1:100 согласно рекомендации фирмы-изготовителя (Dako, Дания). Визуализацию первичных МКАТ, связавшихся с антигенами, проводили стандартным биотин-стрептавидин-пероксидазным методом с использованием набора LSAB-2 (Labeled Streptavidin Biotin System Peroxidase). На заключительном этапе срезы докрашивались толуидиновым синим по Нисслю. Представление о количественном распределении окрашенных клеток получали с помощью программы SigmaScan Pro 5. Статистическая обработка полученных цифровых данных проводилась с использованием пакета программ Microsoft office (Word и Excel). Оценка статистической значимости производилась по *t* критерию Стьюдента и *U* критерию Вилкоксона – Манна – Уитни.

### Результаты исследования и их обсуждение

В селезенке интактных белых беспородных мышей среднее количество NSE-позитивных (NSE<sup>+</sup>) клеток преобладает в периартериальных лимфоидных муфтах (25,6 ± 6,6). В глубоких зонах красной пульпы NSE<sup>+</sup> клетки встречаются неравномерно: имеются участки со скоплениями клеток (53,3 ± 5,6) и участки с небольшим количеством клеток (15,6 ± 1,6). В остальных зонах селезенки количество NSE<sup>+</sup> клеток незначительно.

В ходе цитологического исследования были выделены 5 морфотипов NSE – позитивных клеток:

1) яркие клетки полигональной формы с видимым ядром и с большим количеством крупных NSE<sup>+</sup> гранул, площадью 77,7–82 мкм<sup>2</sup>;

2) яркие округлые клетки с видимым ядром и с большим количеством мелких NSE-позитивных гранул, площадью 55–75 мкм<sup>2</sup>;

3) бледные отростчатые клетки с видимым ядром и с небольшим количеством мелких NSE<sup>+</sup> гранул, площадью 58–78 мкм<sup>2</sup> (рисунок);

4) бледные округлые клетки с видимым ядром и с большим количеством мелких NSE<sup>+</sup> гранул, площадью 9,5–19,6 мкм<sup>2</sup>;

5) мелкие яркие округлые клетки с видимым ядром и с большим количеством крупных NSE<sup>+</sup> гранул, площадью 9,2–12,6 мкм<sup>2</sup>.

Исходя из литературных данных, NSE-позитивными среди иммунокомпетентных клеток могут быть Т-лимфоциты [5, 7],

тучные клетки [10], макрофаги [2], дендритные клетки [8]. NSE-позитивные безъядерные структуры нами не учитывались, так как это, вероятнее всего, тромбоциты и эритроциты [5]. По морфологическим признакам и локализации можно предположить, что клетки 1-го и 2-го типа относятся к макрофагам, либо к тучным клеткам, 3-го типа – к дендритным, а 4-го и 5-го типа, вероятно, к лимфоцитам разной степени зрелости.

В периартериальных лимфоидных муфтах селезенки интактных животных присутствуют клетки всех морфотипов, из которых больше половины составляют клетки 3-го и 4-го типов. В мантийной зоне фолликулов NSE<sup>+</sup> клетки встречаются редко, чаще всего это клетки 4-го типа. В краевой зоне фолликулов исследуемых клеток больше, и чаще других встречаются клетки 1-го, 2-го и 3-го типов. В маргинальных синусах NSE<sup>+</sup> клеток мало, прежде всего, это клетки 4-го типа. Снаружи от маргинальных синусов выделяется пограничная зона красной пульпы. Здесь обнаруживаются ряды NSE<sup>+</sup> клеток, окружающих фолликулы и синусы со стороны красной пульпы. У интактных животных здесь преобладают клетки 1-го и 5-го типов. В глубокой и периферической красной пульпе преобладают клетки 4-го типа.

У контрольных животных NSE –позитивные клетки встречаются в красной пульпе, единично в периартериальных лимфоидных муфтах и белой пульпе. Наибольшее среднее значение количества NSE<sup>+</sup> клеток в поле зрения выявляется в периферической (14,6 ± 2,0) и глубокой зонах красной пульпы (14,5 ± 1,6) селезенки.

При введении дексаметазона достоверно увеличивается количество NSE<sup>+</sup> клеток в периартериальных лимфоидных муфтах (критерий Вилкоксона–Манна–Уитни *P* < 0,01) и снижается в красной пульпе (критерий Вилкоксона–Манна–Уитни *P* < 0,005). Максимальные значения NSE<sup>+</sup> клеток в селезенке животных с введением дексаметазона наблюдаются в периферической и глубокой красной пульпе (26,6 ± 2,2 и 35,8 ± 1,9). На фоне введения преднизолона достоверно увеличивается количество изучаемых клеток в глубокой зоне красной пульпы (критерий Вилкоксона–Манна–Уитни *P* < 0,05) и в периартериальных лимфоидных муфтах (критерий Вилкоксона–Манна–Уитни *P* < 0,01). Максимальные средние значения выявляются в периартериальных лимфоидных муфтах (104,4 ± 7,3), мантийной (17,3 ± 5,8) и краевой (22,6 ± 6,2) зонах лимфоидных узелков.

Более выраженный эффект преднизолона на количество NSE-позитивных кле-

ток разных морфотипов (таблица), возможно, объясняется различным соотношением глюкокортикоидной и минералокортикоидной активности. Более благоприятным соотношением между глюкокортикоидной/противовоспалительной и минералокортикоидной активностью отличается преднизолон. Так, противовоспалительная активность преднизолона (по сравнению с таковой дексаметазона) ниже в 7 раз, при этом влияние на водно-солевой обмен более выражено. Известно, что преднизолон уменьшает общее количество и угнетает пролиферацию лимфоцитов и макрофагов селезенки [6], а дексаметазон вызывает апоптоз лимфоцитов селезенки. Однако

известно, что эффекты глюкокортикоидов дозозависимы, и небольшая доза оказывает обратный эффект [9], что мы и наблюдаем в красной пульпе селезенки, где под действием дексаметазона и преднизолона количество NSE-позитивных клеток всех типов увеличивается. Нами отмечено увеличение количества делящихся клеток в красной пульпе селезенки опытных животных. В лимфоидных узелках под влиянием преднизолона наблюдается снижение количества всех за исключением 1-го типов NSE-позитивных клеток в мантийной зоне и увеличение в краевой зоне. Не было зафиксировано усиление пролиферации.

Изменение количества NSE-позитивных клеток в разных зонах селезенки под влиянием глюкокортикоидов

Морфотипы	ПАЛМ			МЗФ			КЗФ			МС			ПЗКП			ПКП			ГКП		
	К	Д	П	К	Д	П	К	Д	П	К	Д	П	К	Д	П	К	Д	П	К	Д	П
1	0,6	1≈	71*	4,4	2,6	11,8	1,3	1,6**	11,6**	2,9	1,4	1,1**	1,5	0,8	1,4	2,8	4,4**	12,4*	3,1	8,2*	4,4*
2	0,4	0,2	8,8*	2,3	1,2	1,4*	0,4	1,4	2,7**	0,3	2,2	1*	0,4	0,2	1,4	0,3	7,8*	9,4*	1,9	8,4*	4,2*
3	0,1	0,4	6*	1,6	1,4	1,2*	0,4	2,4*	2,7*	0,1	1	1,2*	0,4	0,8	2,2	1,9	3,8	8,2*	3,8	3,8*	4,2
4	1,4	2,6≈	7,4*	3	3,6	1,5*	1,3	2,2	2,9*	2	2,2	1**	1,4	0,8	2,4**	6,6	6,2	8,8	2,3	7,2**	5,8**
5	0,6	1	11,2*	4,4	2,6	1,4*	1,3	1,6	2,7*	2,9	1,4	1*	1,5	0,8	1,4	2,8	4,4*	9,4*	3,1	8,2*	4,2≈

Примечание: К – контрольная группа животных, Д – животные с введением дексаметазона, П – животные с введением преднизолона; \* – достоверность по критерию Вилкоксона – Манна – Уитни  $P < 0,05$ ; \*\* – достоверность по критерию Вилкоксона – Манна – Уитни  $P < 0,01$ ; ≈ – достоверность по критерию Вилкоксона – Манна – Уитни  $P < 0,005$ .

Преднизолон увеличивает количество NSE-позитивных клеток в периартериальных лимфоидных муфтах (см. рисунок). Увеличение количества NSE-позитивных клеток в краевой зоне лимфоидного узелка под влиянием преднизолона, возможно, объясняется миграцией исследуемых клеток из кровяного русла. Аналогичное увеличение исследуемых клеток в красной пульпе под влиянием дексаметазона и преднизолона, очевидно, связано со стимулирующей пролиферацией.

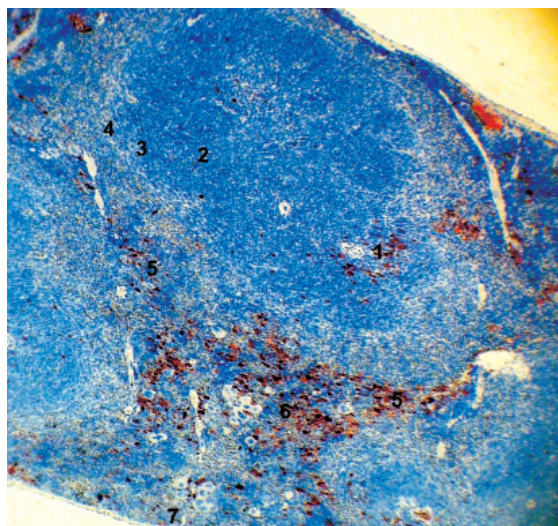
**Выводы**

1. Воздействие дексаметазона приводит к достоверному увеличению NSE-позитивных клеток в красной пульпе, а воздействие преднизолона – в периартериальных лимфоидных муфтах, в лимфоидных узелках, пограничных и глубоких зонах красной пульпы.
2. NSE-позитивные клетки классифицируются по площади клетки, количеству и размеру гранул на 5 морфотипов.
3. Морфотипы NSE-позитивных клеток отличаются локализацией и количественной реакцией на глюкокортикоиды.
4. Выявлено, что преднизолон стимулирует миграцию NSE-позитивных клеток из

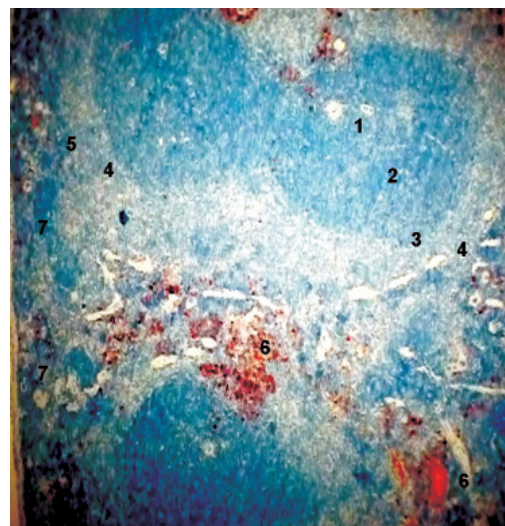
кровенного русла и пролиферацию исследуемых клеток в красной пульпе селезенки, дексаметазон активизирует только пролиферацию исследуемых клеток в красной пульпе селезенки.

**Список литературы**

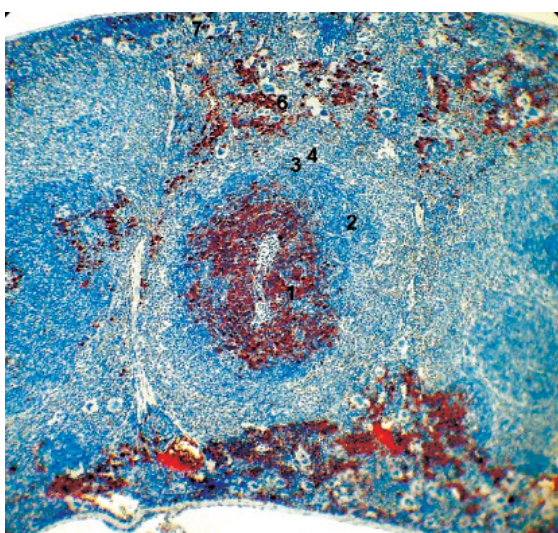
1. Яглов В.В. Маркеры в морфологии и стратегия их исследования // Клиническая морфология новообразований эндокринных желез: сборник научных трудов III научной конференции. – М., 2010. – С. 116–120.
2. Hoedemakers R.M. Histochemical and electron microscopic characterization of hepatic macrophage subfractions isolated from normal and liposomal muramyl dipeptide treated rats / R.M. Hoedemakers, J.E. Atmosoerodjo-Briggs, H.W. Morselt, T. Daemen, G.L. Scherphof, M.J.Hardonk // Liver. – 1995. – Vol. 15, № 3. – P. 113–120.
3. Hori S. Serous cystic neoplasm in an intrapancreatic accessory spleen // Pathol Int. – 2010. – Vol. 60, № 10. – P. 681–684.
4. Hou L. Study of in vitro expansion and differentiation into neuron-like cells of human umbilical cord blood mesenchymal stem cells // Zhonghua Xue Ye Xue Za Zhi. – 2002. – Vol. 23, № 8. – P. 415–419.
5. Houwing H. Noradrenergic and cholinergic reinnervation of islet grafts in diabetic rats // Cell Transplant. – 1996. – Vol. 5, № 1. – P. 21–30.
6. Roohk D.J. Differential in vivo effects on target pathways of a novel arylpyrazole glucocorticoid receptor modulator compared with prednisolone // J Pharmacol Exp Ther. – 2010. – Vol. 333, № 1. – P. 281–289.
7. Shiga Y. 14-3-3 protein levels and isoform patterns in the cerebrospinal fluid of Creutzfeldt-Jakob disease patients in



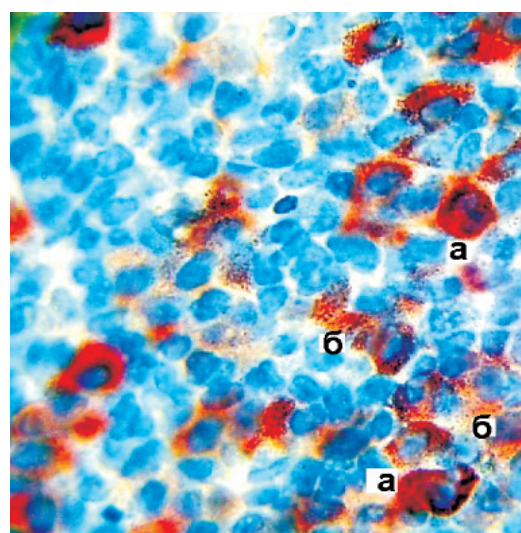
А



Б



В



Г

*Иммунологическая реакция Mo a Hu NSE. Распределение NSE<sup>+</sup> клеток в разных зонах селезенки  
А – контрольных животных, Б – животных с введением дексаметазона,*

*В – животных с введением преднизолона:*

*1 – ПАЛМ (периаартериальная лимфатическая муфта), 2 – МЗФ (мантийная зона фолликула),  
3 – КЗФ (краевая зона фолликула), 4 – МС (маргинальный синус), 5 – ПЗКП (перифолликулярная  
зона красной пульпы), 6 – ГКП (глубокая зона красной пульпы. Микмед-5 10×10. Распределение  
NSE-позитивных клеток разных морфотипов в глубокой красной пульпе селезенки интактного  
животного: а – NSE<sup>+</sup>клетки 2-го типа, б – NSE<sup>+</sup>клетки 3-го типа*

the progressive and terminal stages // J Clin Neurosci. – 2006. – Vol. 13, № 6. – P. 661–665.

8. Sminia T. Characterization of non-lymphoid cells in Peyer's patches of the rat / T. Sminia, M.M. Wilders, E.M. Janse, E.C. Hoefsmid // Immunobiology. – 1983. – Vol. 164, № 2. – P. 136–143.

9. Sterzer P. Long-term in vivo administration of glucocorticoid hormones attenuates their capacity to accelerate in vitro proliferation of rat splenic T cells / P. Sterzer, G.J. Wieggers, J. M. Reul // Endocrinology. – 2004. – Vol. 145, № 8. – P. 3630–3638.

10. Wang, L.H. Bacillary dysentery as a causative factor of irritable bowel syndrome and its pathogenesis // Gut. – 2004. – Vol. 53, № 8. – P. 1096–1101.

#### Рецензенты:

Воронов Л.Н., д.б.н., профессор кафедры биологии и методики преподавания ГОУ ВПО «Чувашский государственный педагогический университет им. И. Я. Яковлева», г. Чебоксары;

Кириллов Н.А., д.б.н., профессор кафедры техносерной безопасности волжского филиала ФГОУ ВПО «Московский автомобильно-дорожный институт», г. Чебоксары.  
Работа поступила в редакцию 09.06.2011.