

УДК 612.438.06:612.018.2:577.175.32

ЭФФЕКТ ХОРИОНИЧЕСКОГО ГОНАДОТРОПИНА НА CD8-ПОЗИТИВНЫЕ СТРУКТУРЫ ВИЛОЧКОВОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Ялалетдинова Л.Р., Ястребова С.А., Сергеева В.Е.

ФГБОУ ВПО «Чувашский государственный университет им. И.Н. Ульянова»,
Чебоксары, e-mail: barbaris09@bk.ru

В опытах на 40 мышках-самках изучены изменения CD8-позитивных структур в тимусе после внутримышечного введения хорионического гонадотропина (ХГ) (0,02 мл раствора) в течение 1, 2, 3, 4 недель. Обнаружено увеличение количества CD8-позитивных клеток через 1 неделю в мозговом и корковом веществах долек тимуса. В кортикомедуллярной зоне количество CD8-позитивных клеток снижается. В последующие сроки введения ХГ во всех исследуемых зонах тимуса количество CD8-позитивных клеток сохраняет тенденцию к увеличению по сравнению с интактной группой. Морфометрический анализ CD8-позитивных клеток тимуса на фоне введения ХГ показал увеличение площади исследуемых клеток по сравнению с интактными животными (у интактных животных – $91,12 \pm 12,00$ мкм²; через 1 неделю введения ХГ – $103,35 \pm 18,61$ мкм²; через 3 недели – $127,28 \pm 17,08$ мкм²; через 4 недели – $191 \pm 15,34$ мкм²).

Ключевые слова: CD8⁺, дендритные макрофаги, хорионический гонадотропин, тимус

CHORIONIC GONADOTROPIN EFFECT ON THE STRUCTURES OF THYMUS EXPRESSING CD8

Yalaltdinova L.R., Yastrebova S.A., Sergeeva V.E.

Federal State Budgetary Institution of Higher Professional Education «The Chuvash State University»,
Cheboksary, e-mail: barbaris09@bk.ru.

In experiments on 40 mice-females changes CD8-positive structures in the thymus after intramuscular introduction of human chorionic gonadotropin (HCG) (0,02 ml) for 1, 2, 3, 4 weeks were studied. An increase in the number of CD8-positive cells and cortical brain chemicals segments of the thymus in a week were revealed. In corticomedullary zone the number of CD8-positive cells is reduced. In the subsequent timing of the introduction of HCG in all the surveyed areas of thymus the number of CD8-positive cells still tends to increase in comparison with the intact group. Morphometric analysis of CD8-positive cells of the thymus the infusion of HCG showed an increase in the area of the investigated cells in comparison with the intact animals (in intact animals $91,12 \pm 12,00$ mkm²; after 1 week of introducing CG – $103,35 \pm 18,61$ mkm²; after 3 weeks – $127,28 \pm 17,08$ mkm²; 4 weeks – $191 \pm 15,34$ mkm²).

Keywords: CD8⁺, dendritic macrophages, chorionic gonadotropin, thymus

Известно, что модуляция иммунного ответа организма хорионическим гонадотропином (ХГ) способствует сохранению беременности [10, 13, 14]. При трофобластической болезни на фоне повышенных концентраций ХГ иммунный противоопухолевый ответ снижается, что способствует гематогенному метастазированию опухоли. При наружном генитальном эндометриозе в периферической крови уменьшается количество CD8-позитивных лимфоцитов (маркер цитотоксических Т-лимфоцитов), а количество моноцитов возрастает [5]. Этапы внутритимусной дифференцировки клеток от мигрировавшего в орган костномозгового предшественника (пре-Т-клеток) до зрелого Т-лимфоцита, покидающего тимус, связаны с изменением экспрессии фенотипических Т-клеточных маркеров. Положительная селекция в коре определяет дальнейшую дифференцировку на субпопуляцию CD4 и CD8-тимоцитов, которая осуществляется в основном в переходной области – кортико-медуллярном соединении под влиянием взаимодействия с ден-

дритными клетками (ДК) и макрофагами. Здесь же проходит и отрицательная селекция тимоцитов. В результате прошедших дифференцировочных событий в медуллярной области накапливаются клетки с фенотипом CD4⁺CD8⁻ (Т-хелперы) и CD4⁺CD8⁺ (Т-киллеры) [2].

Популяция CD8⁺-дендритных клеток неоднородна [8, 6]. При различных физиологических и патологических состояниях реакция CD8⁺-дендритных клеток различна [10]. CD8⁺-дендритные клетки стимулируют вторичные CD4-позитивные лимфоциты [9]. CD8⁺-дендритные клетки фагоцитируют антигены и образуют комплекс с пептидами HLA-II [7]. Клетки-предшественники Т-лимфоцитов (CD4⁺, CD8⁺) синтезируют и содержат серотонин [11].

Методами люминесцентной гистохимии в опытах на белых лабораторных крысах при их беременности установлено, что интенсивность свечения моноаминов в дендритных макрофагах премедуллярной зоны тимусной долики значительно увеличивается [3]. Обнаружено, что концентрация

иммуносупрессорного моноамина серотонина преобладает в тимоцитах мозгового вещества долек тимуса [4].

Цель исследования: изучение популяции CD8-позитивных клеток в различных морфофункциональных зонах долек тимуса мышей-самок у интактных, контрольных и опытных с введением хорионического гонадотропина.

Материалы и методы исследования

Объектом исследования служил тимус 40 белых лабораторных мышей-самок массой 30 г. Животные были разделены на 3 группы: I – интактная группа ($n = 10$); II – контрольная ($n = 10$), которым внутримышечно вводили 0,02 мл физраствора; III – опытная с внутримышечным введением 0,02 мл раствора ХГ: III А – введение ХГ в течение 1 недели (2 раза через каждые 3 дня, $n = 5$), III Б – введение ХГ в течение 2 недель (4 раза через каждые 3 дня, $n = 5$), III В – введение ХГ в течение 3 недель (6 раз через каждые 3 дня, $n = 5$), III Г – введение ХГ в течение 4 недель (8 раз через каждые 3 дня, $n = 5$). Введение препаратов проводилось с соблюдением правил асептики и антисептики. Все процедуры по уходу за мышами осуществляли согласно нормам и правилам обращения с лабораторными животными. Тимус извлекали под наркозом после завершения экспериментального воздействия.

Срезы тимуса обрабатывались на CD8⁺-клеток по стандартной методике: сначала подавлялась пероксидазная активность путем инкубации срезов в 3% растворе H₂O₂ в течение 30 минут с последующей промывкой 0,1М фосфатным буфером. Для блока неспецифического связывания срезы инкубировались в течение 1 часа в 10% козьей сыворотке, после чего к ним были добавлены первичные антитела к белкам CD8 на 18 часов при температуре 4°C. В качестве вторых антител были использованы антивидовые антииммуноглобулиновые биотилированные антитела. С целью выявления биотиновой метки срезы обрабатывались авидин-пероксидазным комплексом. Метод основан на высоком сродстве авидина к биотину. Пероксидазную активность проявляли в инкубационной среде с диаминобензидином. В результате ферментативной реакции субстрат превращался в нерастворимый продукт коричневого цвета, совпадающий по локализации с местонахождением белка [12]. Препараты анализировались под световым микроскопом Микмед-5. В качестве общеморфологического метода использовали окраску срезов тимуса гематоксилин-эозином. Производили подсчет и морфометрический анализ CD8-позитивных клеток в 10 полях зрения с вычислением среднего значения показателей, среднеквадратичного отклонения и критерия достоверности $P < 0,05$. Выводы опираются на достоверные результаты с использованием U-критерия Вилкоксона – Манна – Уитни. Морфометрический анализ включал измерение размеров коркового и мозгового веществ долек тимуса, которое проводилось после получения фотографий при увеличении $\times 100$ (объектив 10 и окуляр 10), а определение размеров клеточных структур при увеличении $\times 400$, $\times 600$ и $\times 1000$ (объективы 40, 60, 100 и окуляр 10) с использованием светового микроскопа МИКМЕД-5. Для морфометрической оценки использовалась программа «Sigma

Scan Pro 5.0». Количество клеток измерялось в десяти квадратах площадью 0,04 мм² в сравниваемых морфофункциональных зонах долек тимуса (корковое, кортико-медуллярная и мозговое вещество).

Результаты исследования и их обсуждение

Изучение распределения CD8-позитивных клеток в дольках тимуса интактных животных показало, что наибольшее количество их выявляется в мозговом веществе ($2,0 \pm 0,2$) и кортикомедуллярной зоне ($1,4 \pm 0,09$) (рис. 1). В корковом веществе долек тимуса визуализируется небольшое количество CD8-позитивных клеток – $0,6 \pm 0,05$ (табл. 1).

CD8-позитивные клетки (размер 8–12 мкм) имеют разнообразную форму (овальную, округлую, сферическую) и лежат в виде вкраплений среди тимоцитов и эпителиальных клеток тимуса. Коричневый цвет в клетках совпадает по локализации с местонахождением белка CD8⁺. Площадь клеток в среднем составляет $91,12 \pm 12,00$ мкм² (табл. 2).

Анализ результатов экспериментального исследования показал, что введение хорионического гонадотропина приводит к изменению количества CD8-позитивных клеток в дольках тимуса в сравнении с контрольной группой. Исследуемые клетки вилочковой железы в основном выявлялись в корковом, мозговом веществах и кортико-медуллярной зоне долек. В корковом и мозговом веществах долек железы CD8-позитивные лимфоциты располагались диффузно. CD8-позитивные клеточные структуры кортико-медуллярной зоны по морфологическим свойствам и расположению совпадают с люминесцирующими гранулярными клетками, идентифицированные как дендритные макрофаги [3]. Известно, что дендритные макрофаги имеют высокие уровни экспрессии CD8⁺ пептидов [1].

По мнению Kronin V., Fitzmaurice C.J. et. al. [9], Mason D.Y., Cordel J.L. et. al. [12] CD8⁺-белок экспрессируется Т-цитотоксическими клетками иммунной системы и дендритными макрофагами. В функции CD8⁺-дендритных клеток входит стимуляция вторичных CD4⁺-лимфоцитов, которая зависит от интерлейкина-2 и интерлейкина-4.

Наши исследования показали, что введение ХГ в течение 1 недели приводит к росту количества CD8-позитивных клеток в мозговом веществе долек тимуса в 4,4 раза ($8,8 \pm 0,9$), в корковом веществе – в 4 раза ($2,4 \pm 0,4$), тогда как в кортикомедуллярной зоне в 2,3 раза снижается количество CD8-позитивных клеток.

Таблица 1

Количественное распределение CD8-позитивных клеток в морфофункциональных зонах долек тимуса мышей: интактных, контрольных (с введением физ. раствора) и при введении хорионического гонадотропина ($M \pm m$)

Морфо-функциональные зоны долек тимуса	Группа экспериментальных мышей								
	Сроки опытов	1 неделя		2 неделя		3 неделя		4 неделя	
	интактные	ХГ	Физ. р-р	ХГ	Физ. р-р	ХГ	Физ. р-р	ХГ	Физ. р-р
Корковое вещество	$0,6 \pm 0,05$	$2,4 \pm 0,4$	$1,2 \pm 0,06$	$3,5 \pm 0,5$	–	$5,2 \pm 0,6$	$1,4 \pm 0,06$	$8,0 \pm 0,4^*$	$1,4 \pm 0,06$
Кортикомедуллярная зона	$1,4 \pm 0,09$	$0,6 \pm 0,05$	$1,0 \pm 0,05$	$2,8 \pm 0,2$	$1,0 \pm 0,05$	$3,6 \pm 0,5$	$1,4 \pm 0,06$	$3,4 \pm 0,05^*$	$1,4 \pm 0,06$
Мозговое вещество	$2,0 \pm 0,2$	$8,8 \pm 0,9$	$2,2 \pm 0,06$	$7,9 \pm 0,6$	$1,9 \pm 0,05$	$6,0 \pm 0,3$	$2,0 \pm 0,05$	$7,6 \pm 0,03^*$	$2,0 \pm 0,05$

Примечание. $*p < 0,05$ по сравнению с интактной группой.

Таблица 2

Морфометрические показатели CD8-позитивных клеток в тимусе мышей: интактных, контрольных (с введением физ. раствора) и при введении хорионического гонадотропина, мкм^2 ($M \pm m$)

Площадь клеток	Группа экспериментальных мышей					
	интактные	Физ. р-р	ХГ 1 неделя	ХГ 2 недели	ХГ 3 недели	ХГ 4 недели
	$91,12 \pm 12,00$	$45,99 \pm 11,66$	$103,35 \pm 18,61$	$75,77 \pm 20,93$	$127,28 \pm 17,08$	$191 \pm 15,34$

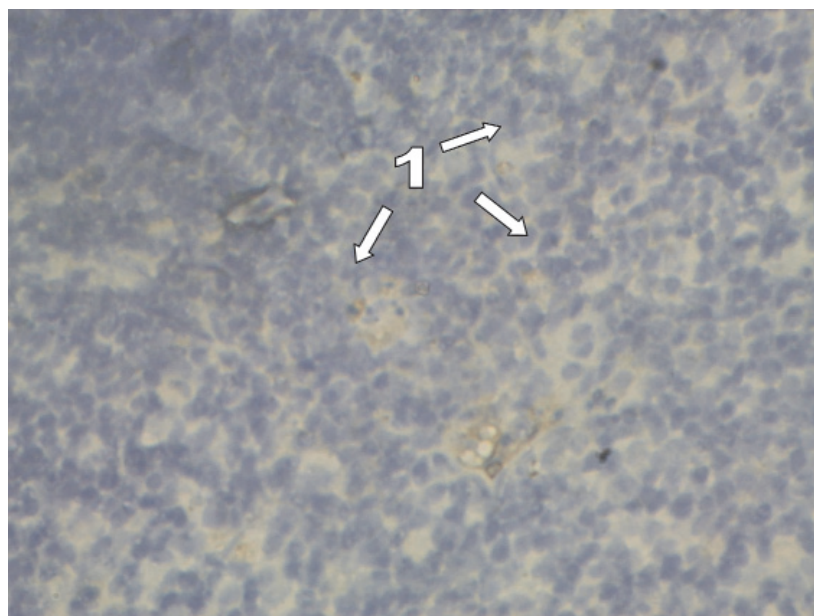


Рис. 1. Тимус мыши. Интактная группа. Иммуногистохимическая реакция с антителами CD8⁺. Микроскоп Микмед-5. Об. 40, ок. 15. 1 – CD8⁺-позитивные клетки

В последующие сроки (2, 3 недели) введения ХГ во всех исследуемых зонах тимуса количество CD8-позитивных клеток продолжает увеличиваться по сравнению с интактными животными (табл. 1).

Через 4 недели экспериментального воздействия гормона количественные показатели содержания цитотоксических лимфоцитов в дольках тимуса остаются высокими.

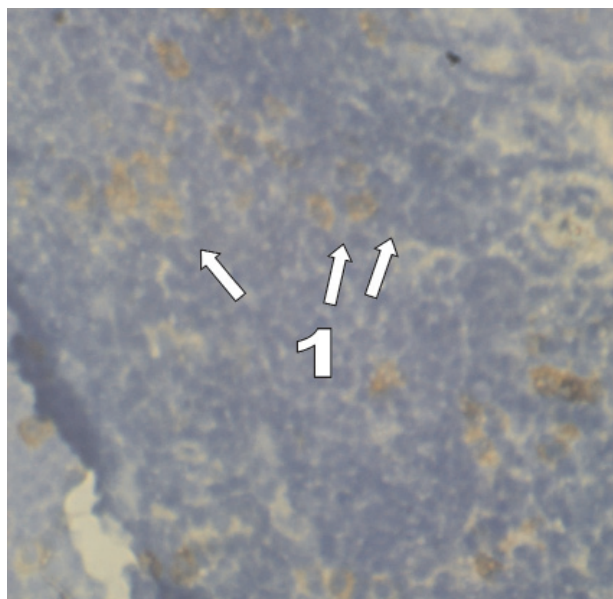


Рис. 2. Тимус мыши. Внутримышечное введение хорионического гонадотропина в течение 4 недель. Иммуногистохимическая реакция с антителами CD8⁺. Микроскоп Микмед-5. Об. 40, ок. 15. 1 – CD8⁺-позитивные клетки

Морфометрический анализ CD8-позитивных клеток тимуса на фоне введения ХГ показал увеличение площади исследуемых клеток по сравнению с интактными животными (у интактных животных – $91,12 \pm 12,00$ мкм²; через 1 неделю введения ХГ – $103,35 \pm 18,611$ мкм²; через 3 недели – $127,28 \pm 17,08$ мкм²; через 4 недели – $191 \pm 15,34$ мкм²) (табл. 2).

В серии работ [10, 13, 14] было показано, что хорионический гонадотропин является основным иммунодепрессантом в организме. Наши исследования показали, что под влиянием ХГ происходит увеличение количества CD8-позитивных клеток у мышей-самок в центральном органе иммунитета и увеличению площади CD8⁺-позитивных клеток, что свидетельствует об усилении функциональной активности этих клеток.

Дендритные клетки также экспрессируют CD8⁺ белок, продуцируют интерферон, стимулируют воспалительные процессы, обеспечивают толерантность к аутогенным клеткам. В наших исследованиях обращает на себя внимание ситуация с дендритными макрофагами кортикостероидной зоны вилочковой железы, где количество CD8⁺-позитивных дендритных клеток уменьшается через 1 неделю введения ХГ, а в последующие сроки – через 2, 3, 4 недели введения ХГ – значительно увеличивается их количество и площадь клеток.

В мозговом веществе долек через неделю введения ХГ достоверно увеличивается количество CD8-позитивных клеток по

сравнению с интактной группой, очевидно, хорионический гонадотропин способствует усилению образования цитотоксических лимфоцитов в тимусе. Через 2, 3 и 4 недели введения ХГ отмечается незначительное уменьшение CD8⁺ клеток в сравнении с 1-недельным сроком воздействия. Возможно, усилена миграция цитотоксических лимфоцитов из мозгового вещества долек тимуса.

Заключение

Таким образом, введение хорионического гонадотропина в течение 1, 2, 3 и 4 недель оказывает иммуномодулирующее влияние на микроструктуры тимуса мышей-самок и приводит:

- 1) к увеличению количества CD8⁺-клеток в корковом и мозговом веществе, кортикостероидной зоне долек тимуса;
- 2) к увеличению площади CD8⁺-позитивных клеток, что свидетельствует об усилении функциональной активности этих клеток.

Работа выполнена на кафедре медицинской биологии с курсом микробиологии и вирусологии. Госбюджетная тема 0120.085.1887 от 2008 г. «Гистохимия биогенных аминов в морфофункциональном состоянии органов и тканей в норме и эксперименте».

Список литературы

1. Ахматова Н.К., Киселевский М.В. Врожденный иммунитет: противоопухолевый и противои инфекционный. – М.: Практическая медицина, 2008. – 256 с.

2. Бибик Е.Ю., Берест А.Ю. Современные представления о морфогенезе первичного лимфоидного органа // Украинский морфологический альманах. – 2011. – Том 9, № 3. – С. 43–46.
3. Гордон Д.С., Сергеева В.Е., Смородченко А.Т., Олангин О.И. и др. Идентификация люминесцирующих гранулярных клеток тимуса с дендритными макрофагами // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2001. – Т. 123. – № 1. – С. 118–120.
4. Гордон Д.С., Сергеева В.Е., Ястребова С.А. и др. Люминесцентная морфология биоаминов тимуса в условиях иммуносупрессии // International Journal on Immunorehabilitation. – 1999. – P. 81.
5. Павлов Р.В. Клинико-экспериментальное обоснование использования иммуномодуляторов в комплексной терапии наружного генитального эндометриоза: автореф. дис. ... д-ра мед. наук. – СПб., 2009. Морфология в теории и практике: сб. материалов и тезисов. – Чебоксары: Изд-во Чуваш. ун-та, 2012. – 40 с.
6. Ястребова С.А., Сергеева В.Е., Аюпова (Ялалетдинова) Л.Р. Морфометрический анализ структур тимуса и яичников под воздействием гонадотропина // Морфология в теории и практике: сб. материалов и тезисов. – Чебоксары: Изд-во Чуваш. ун-та, 2012. – С. 296–297.
7. Iyoda T., Shimoyama S., Liu K. et al. The CD8⁺ Dendritic Cell Subset Selectively Endocytoses Dying Cells in Culture and In Vivo // J. Exp. Med. – 2002. – Vol. 195, № 10. – P. 1289–1302.
8. Kamiński P., Skopińska-Różewska E., Wasik M., Bany J., Barcz E., Sommer E., Marianowski L. Thymus and lymph node cell CD4(+) and CD8(+) marker expression and their angiogenic activity of offspring of salbutamol-treated pregnant C3H mice // Pharmacol Res. – 2000. – Vol. 41(1). – P. 95–99.
9. Kronin V., Fitzmaurice C.J., Caminschi I. et al. Differential effect of CD8⁺ and CD8⁻ dendritic cells in the stimulation of secondary CD4⁺ T cells // International Immunology. – 2001. – Vol. 13. – № 4. – P. 465–473.
10. Kuklina E.M., Shirshov S.V., Sharova N.I., Iarilin A.A. Role of chorionic gonadotropin in the differentiation of thymocytes // Ontogenez. – 1999. – Vol. 30(5). – P. 341–345.
11. Kvetnoy I.M., Polyakova V.O., Trifonov A.V., Yuzhakov V.V. Hormonal function and proliferative activity of thymic cells in humans: Immunocytochemical correlations // Neuroendocrinology Letters 2003. Nos. 3/4, Jun-Aug, Vol. 24. – P. 263–268.
12. Mason D.Y., Cordell J. L., Gaulard P. et al. Immunohistological detection of human cytotoxic/suppressor T cells using antibodies to a CD8 peptide sequence // Journal of Clinical Pathology. 45: 1084–1088 (1992).
13. Tamiolakis D., Venizelos I., Kotini A., Nikolaidou S., Papadopoulos N. Prevalence of CD8/CD4 ratio in the fetal thymic parenchyme in Down's syndrome // Acta Medica (Hradec Kralove). 2003. Vol. 46 (4). pp. 179–182.
14. Zhou C., Jean Wu, Borillo J., Torres L., McMahon J., Lou Ya-Huan. // J Immunol. – 2009. Vol. 182(1). – P. 596–603.
3. Gordon D.S., Sergeeva V.E., Smorodchenko A.T., Olan-gin O.I. I dr. Identifikatsiya luminestsiruyuschikh granulyarnykh kletok timusa s dendritnymi makrofagami / Byulleten eksperimentalnoy biologii i meditsiny. 2001. T. 123. no. 1. pp. 118–120.
4. Gordon D.S., Sergeeva V.E., Yastrebova S.A. i dr. Luminestsentnaya morfologiya bioaminov timusa v usloviyakh immunosupressii / International Journal on Immunorehabilitation, 1999. pp. 81.
5. Pavlov R.V. Kliniko-eksperimentalnoe obosnovanie ispolzovaniya immunomodulyatorov v kompleksnoy terapii naru-zhnogo genitalnogo endometrioza. Avtoref.dis.... d.m.n. SPb, 2009. 40 p.
6. Yastrebova S.A., Sergeeva V.E., Ayupova (Yalaletdino-va) L.R. Morfometricheskij analiz struktur timusa i yaichnikov pod vozdeystviem gonadotropina / Morfologiya v teorii i praktike: sb. Materialov i tezisov. Cheboksary: Chuvash. un-ta, 2012. pp. 296–297.
7. Iyoda T., Shimoyama S., Liu K. et al. The CD8⁺ Dendritic Cell Subset Selectively Endocytoses Dying Cells in Culture and In Vivo // J. Exp. Med. 2002. Vol. 195, no. 10. pp. 1289–1302.
8. Kamiński P., Skopińska-Różewska E., Wasik M., Bany J., Barcz E., Sommer E., Marianowski L. Thymus and lymph node cell CD4(+) and CD8(+) marker expression and their angiogenic activity of offspring of salbutamol-treated pregnant C3H mice // Pharmacol Res. 2000. Vol. 41(1). pp. 95–99.
9. Kronin V., Fitzmaurice C.J., Caminschi I. et al. Differ-ential effect of CD8⁺ and CD8⁻ dendritic cells in the stimulation of secondary CD4⁺ T cells // International Immunology. 2001. Vol. 13. no. 4. pp. 465–473.
10. Kuklina E.M., Shirshov S.V., Sharova N.I., Iarilin A.A. Role of chorionic gonadotropin in the differentiation of thymo-cytes // Ontogenez. 1999. Vol. 30(5). pp. 341–345.
11. Kvetnoy I.M., Polyakova V.O., Trifonov A.V., Yu-zhakov V.V. Hormonal function and proliferative activity of thymic cells in humans: Immunocytochemical correlations // Neuroendocrinology Letters 2003. Nos. 3/4, Jun-Aug, Vol. 24. pp. 263–268.
12. Mason D.Y., Cordell J. L., Gaulard P. et al. Immunohis-tological detection of human cytotoxic/suppressor T cells using antibodies to a CD8 peptide sequence // Journal of Clinical Pa-thology. 45: 1084–1088 (1992).
13. Tamiolakis D., Venizelos I., Kotini A., Nikolaidou S., Papadopoulos N. Prevalence of CD8/CD4 ratio in the fetal thymic parenchyme in Down's syndrome // Acta Medica (Hradec Kralove). 2003. Vol. 46 (4). pp. 179–182.
14. Zhou C., Jean Wu, Borillo J., Torres L., McMahon J., Lou Ya-Huan. // J Immunol. 2009. Vol. 182(1). pp. 596–603.

References

1. Akhmatova N.K., Kiselevskiy M.V. Vrozhdennoy immu-nit: protivopukholevy i protivoinfektsionny. M.: Praktiches-kaya meditsina, 2008. 256 p.
2. Bibik E.Yu., Berest A.Yu. Sovremennyye predstavleniya o morfogeneze pervichnogo limfoidnogo organa // Ukrainskiy morfologicheskij almanakh, 2011. Tom 9, no. 3. pp. 43–46.

Рецензенты:

Алексеев В.В., д.б.н., профессор кафе-дры биоэкологии и географии, декан фа-культета естественнонаучного образования, ФГБОУ ВПО «Чувашский государственный педагогический университет им. И.Я. Яков-лева», г. Чебоксары;

Долгов И.Ю., д.м.н., профессор, глав-ный врач БУ ЧР «Республиканский кли-нический онкологический диспансер», г. Чебоксары.

Работа поступила в редакцию 23.07.2014.